

Ⅱ. 分担研究報告

1. 課題 1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

研究分担者 根本 了

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

課題1:欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

研究代表者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

欧米等(EU、米国、国際機関等)における、食品中に残留する農薬等の分析法開発の方針、開発の方法及び評価基準等について調査し、技術的な観点から、日本との比較、海外の手法の日本の試験法開発への適用の必要性などについてまとめる事を目的とした。28年度の農薬の残留分析法に続き、29年度は動物用医薬品及び畜産物の残留分析法について調査した。

農薬及び動物用医薬品ともに、分析法の抽出効率が、真の残留濃度を測定するための最も重要な要素であった。そのため、試験法開発に関しては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同様な考え方を適用できると思われる。以下に分析法開発に関する基本的な考え方をまとめた。

1. 抽出効率の評価は、放射性標識された分析対象化合物を用いたラジオバリデーションによって行うべきであり、ラジオバリデーションにより確立された申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。適切な検証が行えない場合には、申請時の抽出法を用いる。
2. 適切な抽出効率を確保するためには、バリデーションされた抽出法は変更せずに実施する。
3. 分析法を変更する場合は、抽出液を得た以降の精製操作に対してのみ行うのが原則である。
4. 抽出法を変更する場合は、1) 認証標準物質を用いた評価、2) 参照分析法との分析値の比較、3) 実残留試料を用いた抽出法の比較、4) 添加回収試験により評価する。

実残留試料を用いた評価も、実際の検査機関では実施が困難であると思われることから、試験法を開発する場合や抽出法を変更する場合には、添加回収試験が最も採用可能な方法であると考えられる。しかし、添加回収試験は実際の抽出効率を反映しない場合があることに留意し、抽出法の開発・変更に当たっては慎重に行うことが望まれる。

分析法の評価パラメータについては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同じであったが、目標値については国・機関により異なる場合があった。パラメータ及び目標値については、分析法の評価の判断に差が生じないように、各国の動向も踏まえ、必要に応じて見直すことが望ましいが、その際には Codex ガイドライン CAC/GL 90-2017 等が参考になると思われる。

A. 研究目的

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度の導入に伴い、約 800 品目の農薬等に基準値が設定された。食品の安全性確保のためには、これらの農薬等の食品中の残留について分析・監視する必要があり、そのためには効率的かつ精確に定量

可能な分析法の確立が望まれている。

我が国では、食品中の残留農薬等の基準値が遵守されていることを確認するための分析方法として、厚生労働省から公示試験法が告示又は通知されている。公示試験法の開発は、厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長のもとに設置された「残留農薬等試験法開発事業評価会議(旧残

留農薬等公示分析法検討会)」及び「試験法開発事業連絡会議(旧残留農薬等分析法検討会)」において行われている。試験法開発に当たっては、評価会議において「残留農薬等試験法検討実施要領」を作成し、本実施要領に基づいて試験法開発が行われている¹⁾。本実施要領は、これまでの評価会議での残留試験法の開発方針等についてまとめたものであるが、食品中の残留農薬等試験法開発のための公的なガイドラインとしては示されていない。

食品の輸出入が増加し、食品中の残留農薬等の安全性について関心が高まる中、食の安全を確保するためには残留農薬等の検査が重要な役割を担っているが、国際貿易の場において検査結果の信頼性を相互に確保するためには、残留農薬等の検査に用いる分析法についても技術的進歩や国際的な動向等も踏まえて国際的な調和を図る必要がある。残留農薬等試験法開発において国際的整合性を考慮することにより、試験法の国際協調が図られ、食品の輸出入時の検査結果についても国際協調を図ることができる。更には試験法の違いによる係争を避けることも期待できる。また、試験法開発の効率化・信頼性の向上が期待される。

そこで、本研究では、欧米等(国際機関、EU、米国、オーストラリア等)における、食品中に残留する農薬等の分析法開発の方針、開発の方法及び評価基準等について調査し、技術的な観点から、日本との比較、海外の手法の日本の試験法開発への適用の必要性などについてまとめる事を目的とした。食品中の残留分析法の開発については、農薬と動物用医薬品とでは、国際機関及び諸外国では一般に開発主体(組織・団体)が異なる。そこで、28年度は農薬の残留分析法について、29年度は動物用医薬品及び畜産物を対象とした残留分析法について調査した。これらの調査結果を

踏まえ、農薬等の残留試験法について、技術的な観点から海外の手法の日本への適用の必要性などについてまとめた。

B. 研究方法

29年度は、欧米等の公的機関等(国際機関、EU、米国、オーストラリア及びニュージーランドなど)において公開されている動物用医薬品及び畜産物の残留分析法の開発に関するガイドライン等について調査した。その結果、本検討では以下の各指針等について、分析法の開発の方針及び評価基準等についてまとめた。

(1) 厚生労働省(日本)

食品中の残留農薬等試験法については、諸外国では、農薬と動物用医薬品とで一般に所管が異なることから、関連する指針等も別々に示されている。一方、日本ではいずれも厚生労働省の食品基準審査課において、前出の「残留農薬等試験法検討実施要領」¹⁾に基づいて開発が行われている。本実施要領の内容については28年度の報告書にまとめた。

(2) 農林水産省(日本)

動物用医薬品の承認申請の際に必要な添付資料等の作成等については、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて[12 動薬 A 第 418 号農林水産省動物医薬品検査所長通知(平成 12 年 3 月 31 日付け、一部改正 平成 30 年 2 月 28 日 29 動薬第 3867 号)]²⁾で示されている。動物用医薬品の残留分析法に関しては、当該通知の「別添 2 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン等」の「14 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン」で示されていることから、この内容についてまとめた。

(3) EU

EU では、動物及び動物由来製品における動物用医薬品を含む有害物質の残留を監視するための分析法に関する性能基準等をまとめたガイドラインとして、「COMMISSION DECISION 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results」³⁾が示されており、本ガイドラインについてまとめた。

(4) FDA(米国)

米国食品医薬品局(FDA)の食品・動物用医薬品部(OFVM)では、FDA 試験室において実施されている、食品や飼料を対象とした規制遵守、調査及び規制施行を目的とした日常監視プログラムや緊急対応において、化学物質等を検出するために使用される化学分析法が満たすべき性能基準等を、「Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition」⁴⁾(翻訳版(仮訳)を資料①として添付)として、科学研究運営委員会(SRSC)*を通じて示している。これらの基準は、すべての食品・動物用医薬品(FVM)プログラムの化学分析法を評価・検証するための基準であり、FVM プログラムの実施を想定した化学分析成分のための規制分析法の開発、及びその妥当性評価に参加する際に FDA 試験室に適用される。本ガイドラインについてまとめた。

*FDA 食品・動物用医薬品(FVM:Foods and Veterinary Medicine) 科学研究運営委員会(SRSC: Science and Research Steering Committee)は、食品動物用医薬品部(OFVM:Office of Foods and Veterinary Medicine)、食品安全・応用栄養センター(Center for Food Safety and Applied Nutrition)、動物用医薬品センター(Center for Veterinary Medicine)、規制業務部(Office of Regulatory Affairs)、国立毒性研究センター(National Center for Toxicological Research)、国際部(Office of International Programs)及びチーフ・サイエンティスト部(Office of the

Chief Scientist)の代表者で構成される。SRSC は、FDA の FVM プログラムの作業班全体に関わる、食品・飼料関連の科学及び調査活動の優先順位を付け、調整し、統合する任務を負っている。

(5) オーストラリア

オーストラリアでは、農薬等の登録は農薬・動物用医薬品局(Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority: APVMA)が所管している。APVMA より動物用医薬品の承認申請に必要な手順やデータ等が「Veterinary Manual of Requirements and Guidelines - Vet MORAG」として示されており、その中の「Part 5A - Residues」⁵⁾(翻訳版(仮訳)を資料②として添付)において残留分析法について示されている。また、オーストラリアでは、動物用医薬品の承認申請の際に分析法も合わせて提出することになっており、その分析法の要件については「Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods」⁶⁾(翻訳版(仮訳)を資料③として添付)に規定されている。APVMA からは、このほか動物用医薬品の承認申請時の残留分析法に関するガイドラインとして「Analytical Methodology」⁷⁾(翻訳版(仮訳)を資料④として添付)が示されている。これら3つのガイドラインについてまとめた。

(6) ニュージーランド

ニュージーランドでは、農薬等の登録は第一次産業省(Ministry for Primary Industries: MPI)が所管している。登録申請に必要なデータ等についてはMPIより「Residue Data for Agricultural Chemical Registration ACVM Information Requirements 41」⁹⁾として示されており、残留分析法もその中に含まれている。本ガイドラインでは、残留分析法はOECD(Organisation for Economic Co-operation and Development)のガイドライン(OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5)

の要件に従うことが規定されている。この OECD ガイドラインのうち、畜産物の分析法開発に関連する記載があるガイドラインとしては「OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 503: Metabolism in Livestock」¹¹⁾がある。本ガイドラインについては、(8) OECD の項に記載した。

(7) コーデックス委員会

コーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission: CAC)からは、残留動物用医薬品部会 (Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods: CCRVDF)において作成された動物用医薬品の残留規制のための分析法に関連するガイドラインが、「Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (CAC/GL 71-2009).」¹¹⁾(残留規制のための分析法(134～195 項)の部分を抜粋した翻訳版(仮訳)を資料⑤として添付)として示されており、本ガイドラインについてまとめた。本ガイドラインは、残留動物用医薬品に対する食品安全保証プログラムの設計及び実施に関する包括的な原則を示したものである。そのため、ガイドラインには試料採取の原則等を含む安全保証プログラムの策定に関する全般的な内容が含まれているが、この中で残留規制のための分析法について規定している部分について整理した。

(8) OECD

(6) ニュージーランドの項で記載したように、畜産物の分析法に関連するガイドラインとして、「OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 503: Metabolism in Livestock」¹¹⁾(翻訳版(仮訳)を資料⑥として添付)についてまとめた。本ガイドライン

は化学物質の家畜代謝に関するガイドラインであるが、リスク評価及び規制施行で分析される対象成分に関する情報を提供する試験であることから、検討に用いられた分析法は、畜産物の規制のための分析法としても有用である。

C. 研究結果及び考察

1. 分析法の開発の方針について

B. 研究方法で示したガイドライン等について、分析法の開発方針に関連する事項についてまとめた。

(1) 農林水産省(日本)

12 動薬 A 第 418 号農林水産省動物医薬品検査所長通知(平成 12 年 3 月 31 日付け、一部改正平成 30 年 2 月 28 日 29 動薬第 3867 号)の「別添 2 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン等」の「14 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン」²⁾

「14 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン」は、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される残留性に関する試験について、標準的な実施方法を示したものであり、14-1～14-6 の 6 項目からなる。この中で残留分析法に関連する事項として、14-1 では試験の目的の一つとして、残留基準値遵守の確認を目的とした分析法における指標物質となりうる残留物に関するデータを提供することを上げており、適切な指標残留の特徴の一つとして、残留基準値の濃度で、指標残留を分析するための実用的な分析方法がある事としている。14-3 では、試験の目的の一つは薬剤投与後、指標残留が、規制の安全基準(例えば、残留基準値又はトレランス)まで減衰することを証明することとし、分析法は、組織又は畜産物中の指標残留を、適切な濃度(すなわち MRL 又はトレランス)で、確実に検出できる方法でなければならないとしている。

また、14-5 のガイドラインは、動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための残留試験において使用される分析法のバリデーションを示したものであり、残留規制のための分析法の手順を示したものである。しかし、この情報は、各国における残留規制に用いられ、多くの場合、バリデートされた組織中の残留物の分析手法は、規制当局による残留モニタリングの分析方法の基礎となる、としている。

以下に 14-1、14-3 及び 14-5 の該当部分を抜粋した。

『14-1 食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：残留物の定性及び定量のための代謝試験 (VICH GL46)』

(2) 指針/A 目的

動物用医薬品の食品の安全性評価は、投薬動物に由来する食品を人が摂取しても安全であることを担保することに役立つものであることから、データ収集の一部として、動物用医薬品の投与動物に由来する食品中の残留量及び残留物の性状を明らかにするための試験を実施しなければならない。これらの代謝試験は、①動物用医薬品投与後の複数の時点における投与動物の可食組織での対象物の残留の消失性、②可食組織中における対象物の残留を構成する個々の残留成分又は残留物、③残留基準値遵守の確認(すなわち動物用医薬品の適正使用に関するモニタリング)を目的とした分析法における指標物質となりうる残留物及び④国内又は地域のモニタリングのための標的組織の特定、に関するデータを提供する。

(2) 指針/U 残留物の定性及び定量のための試験/(エ)代謝物の分離及び確認/(i)分析方法

試験報告書には、分析方法の詳細を記載する。その記載には、標準品、試薬、溶液及び分析用試

料(残留物の抽出、分画、分離及び単離)の調製、使用機器並びに標準品、対照組織、薬剤添加組織及び薬剤投与動物から採材した組織のデータを含む。分析方法については、少なくとも回収率、検出限界及び変動性のバリデーションを行わなければならない。

(3) データの報告

総残留に対する指標残留の比、指標残留及び標的組織が、国又は地域の規制当局から要求される場合、これらを決定するためのデータを示さなければならない。各採材時点における各組織の総残留濃度を報告する。様々な処理(酵素、酸等)を用いて抽出される総残留の放射活性量(抽出率)も示す。標的組織は、対象動物中の総残留をモニターするために選択された可食組織である。標的組織は、必ずではないが、通常、残留消失が最も遅い組織である。

総残留濃度との比較のために、各採材時点における総残留の構成成分についても報告する。指標残留を選択するために、総残留の構成成分(親化合物及び代謝物)について検討する。指標残留は、通常、親化合物であるが、親化合物と代謝物との組み合わせ又は1つの誘導体若しくはフラグメント分子に化学的に変換した残留物の合計とする場合がある。

適切な指標残留には、以下の特徴がある。

① 対象組織において、指標残留と総残留の濃度の間に確立された既知の関係がある。

② 指標残留は、注目すべき時点(すなわち休薬期間時点付近)における残留性を分析するために適切でなければならない。

③ 残留基準値の濃度で、指標残留を分析するための実用的な分析方法がある。』

『14-3 食用動物における動物用医薬品の代

謝及び残留動態を評価するための試験：製剤の休薬期間確立のための指標残留減衰試験（その1）（VICH GL48R）」

（2）指針／ア 目的

本指針では、以下の目的のため、推奨される新動物用医薬品の承認に適用される対象動物での指標残留減衰試験を示す。

・薬剤投与後、指標残留が、規制の安全基準（例えば、残留基準値又はトレランス）まで減衰することを証明すること

・消費者の安全性の懸念に対処した適切な休薬期間及び使用禁止期間の設定にふさわしいデータを作成すること

（2）指針／エ 指標残留の定量のための分析方法

残留減衰試験において可食組織（該当する場合には乳汁及び卵）から得られる試料中の指標残留の検出のために、承認申請者は、適切な分析方法を提出する。分析方法は、組織又は畜産物中の指標残留を、適切な濃度（すなわち MRL 又はトレランス）で、確実に検出できる方法でなければならない。

分析方法のバリデーションに必要なパラメータは、14-5（VICH GL49）による。』

『14-5 食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：残留試験において使用される分析方法のバリデーション（VICH GL49R）」

（1）緒言／イ 背景

残留減衰試験は、動物用医薬品の開発過程において、動物用医薬品を投与された動物の可食組織（組織、乳、卵又は蜂蜜）中に存在する1つ以上の残留物の濃度を測定するために実施される。この情報は、各国における残留規制に用いられる。

残留規制のための分析方法（すなわち、承認後の残留モニタリングの分析方法）の提出及びそのバリデーションの要件については、通常、各国の規制当局によって適切に定められており、国又は地域の法律によって定められる場合もある。しかし、残留減衰試験は、通常、残留規制のための分析方法が確立される前に実施される。多くの場合、バリデートされた組織中の残留物の分析方法は、規制当局による残留モニタリングの分析方法の基礎となる。残留減衰試験で使用され、残留基準（MRL）及び休薬期間を裏付けるために規制当局に提出される分析方法のバリデーションの要件については、国際的に調和されなければならない。本指針の意図は、VICH 地域の規制当局が受け入れ可能な、残留減衰試験で使用するためのバリデーションの手順を提示することにある。このバリデートされた分析方法は、後に修正され「残留規制のための分析方法」となるかもしれないが、本ガイドラインではその段階の過程については記述しない。

分析方法に関する様々なバリデーションのガイドラインがあり、それらのバリデーションの手順の多くが、指針に取り入れられている（VICH GL1（バリデーションの定義。1998年10月）及びVICH GL2（バリデーションの方法論。1998年10月））。しかし、本指針で記述される動物用医薬品の残留分析方法に関するバリデーションの手順については、以前の指針では記述されていない。本指針では、特に動物用医薬品の残留分析方法のバリデーションについて記述することを意図している。』

（参考）

VICH（International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products：動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力）は、動物用医薬品の承認申請資料の共通利用を通じて開発費の削減や承認審査の迅速化することで、臨床現場への安価かつ迅速な動物用医薬品の供

給を図ることを目的として、1996年に国際獣疫事務局(OIE)傘下で日米EUの三極の規制当局及び企業代表をメンバーとして組織された。VICH GLはVICHにより示されたガイドラインを指す。

(2) EU

COMMISSION DECISION 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results³⁾

COMMISSION DECISION 2002/657/ECの付属文書で分析法の性能基準、その他の要求事項及び手順が示されている。その中で、回収率は認証標準物質(Certified reference material: CRM)を用いて求めるのが基本であり、そのような認証標準物質が入手できない場合に、添加試料から得られた回収率により評価することが許容されるとしている。以下に、関連部分を抜粋した。

『1. 定義

1.7. 「認証標準物質」とは、規定量の分析成分を含有した物質をいう。

1.27. 「回収率」とは、分析手順において回収された物質の真の濃度のパーセンテージをいう。認証標準物質を入手できない場合、回収率は妥当性評価において決定される。

2. 分析法の性能基準及びその他の要求事項

2.3. 有機残留物及び汚染物質の確認分析法

2.3.2. 定量分析法についての追加の性能基準及びその他の要求事項

2.3.2.1. 定量分析法の真度

認証標準物質の繰り返し分析の場合、実験的に決定された回収率で補正された平均質量分率の認証値からの逸脱に関するガイドラインの範囲は、以下の通りである。

表2 定量分析法の最小真度

質量分率	範囲
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	- 50 % ~ + 20 %
$> 1 \mu\text{g/kg} \sim 10 \mu\text{g/kg}$	- 30 % ~ + 10 %
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	- 20 % ~ + 10 %

そのような認証標準物質が入手できない場合、測定値の真度は、既知量の分析成分をブランクマトリックスに添加して得られた回収率により評価することが許容される。平均回収率で補正されたデータは、表2に示す範囲内にある場合のみが許容される。』

『3. 妥当性評価(バリデーション)

3.1. バリデーション手順

3.1.1. モデルによらない性能特性

3.1.1.2. 真度 Trueness

本項では、真度(精確さの要素の一つ)の測定について説明する。真度は認証標準物質(CRM)によつてのみ設定することができる。CRMが入手可能な場合はこれを必ず用いること。手順についてはISO 5725-4 (5)で詳しく説明されている。以下に例を示す。

— 分析法の指示書に従って、CRMを6回繰り返し分析する。

— 各繰り返し分析試料中の分析成分濃度を測定する。

— これらの濃度の平均値、標準偏差及び変動係数(%)を計算する。

— 検出された平均濃度を認証値(濃度として測定)で除し、結果をパーセンテージで表すために100を乗じて真度を算出する。

真度(%) = 平均回収率で補正された検出濃度 × 100 / 認証値

CRMが入手できない場合、真度の代わりに、下記の3.1.2.1に記載されているように回収率を算出することができる。』

『3.1.2.1. 回収率 Recovery

CRM が入手できない場合、回収率は添加ブランクマトリックスを用いた実験により測定されなくてはならない。以下にそのスキームを例示する。

- 18 等分(アリコート aliquots)のブランク試料を選択し、最小要求性能限界*の 1、1.5 及び 2 倍の濃度又は許容基準の 0.5、1 及び 1.5 倍ごとに 6 アリコートに添加する。
- 試料を分析し、各試料に存在する濃度を算出する。
- 以下の式を用いて、各試料の回収率を算出する。
- 各濃度における 6 つの結果から平均回収率及び CV を算出する。
- %回収率 = $100 \times \frac{\text{測定濃度}}{\text{スパイク添加濃度}}$ (以下略)

*「最小要求性能限界(minimum required performance limits: MRPL)」とは、少なくとも検出及び確認されなくてはならない試料中の分析成分の最低含有量をいう。MRPL は、許容基準が設定されていない物質の分析法の分析性能の調和を意図するものである。』

(3) FDA(米国)

Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition⁴⁾

本ガイドラインは、化学分析成分のための規制分析法の開発、及びその妥当性評価に参加する際に FDA 試験室に適用される。また、ガイドラインに記載された要件は、新たに開発された分析法及び既存の分析法に重大な変更がなされた場合にのみ適用される。

分析法の妥当性評価に当たっては、可能であればマトリックスブランク、参照物質及び実残留試料の使用が推奨されている。以下に関連する部分を抜粋した。

『2.1 一般的な妥当性評価ツール及びプロトコルガイダンス General Validation Tools and Protocol Guidance(抜粋)

一般的プロトコル(General Protocol):分析法妥当性評価レベルの項及び下記の表 1 で一般的に記載されるように、既知濃度の分析法ブランク*、マトリックスブランク、参照物質(入手可能な場合)及びマトリックススパイク(利用可能な場合はマトリックスブランクを使用)を準備して分析する。精確さ又はバイアス及び精度が、これらの結果から計算される。データはまた、試料マトリックスの変化に起因する分析法のマトリックス効果及び堅牢性/頑健性を評価するためにも用いられる。

参照物質及び認証標準物質(Reference materials and certified reference materials):既知の参照物質(利用可能で適用可能な場合)の使用は、分析法の精確さ又はバイアスの評価、ならびに干渉に関する情報を得るために組み込まれるべきである。

マトリックスブランク(Matrix Blank):この種のブランクは、マトリックス成分に関して分析される試料と厳密に一致する物質である。マトリックスブランクは、分析成分のバックグラウンドレベル(有無)を確立し、試料マトリックス及び装置が分析信号に干渉しないか、又は影響しないことを確認するために用いられる。

マトリックススパイク(試験室添加マトリックス)[Matrix Spikes (Laboratory Fortified Matrix)]:回収率測定は、既知量の分析成分をスパイクし、添加回収率を算出することで推定できる。(注:添加回収率は、自然に生じた分析成分の回収率を正確に反映しているとは限らない。)これらの試料で、マトリックス効果も評価することができる。精確さ又はバイアス及び精度が、これらの結果から計算される。データは、また、試料マトリックスの変化に起

因する分析法の頑健性を評価するために用いることもできる。

実残留試料 (Incurred Samples) : この種の試料 (入手可能な場合) は、対象となる分析成分 (試験室添加ではない) を含み、精度及びバイアスを評価するために用いることができる (分析成分濃度が高い信頼性で既知である場合)。分析成分の回収率はまた、試料の連続抽出及び/又は既知のバイアスを有する他の分析手順との比較により評価することができる。

* 分析法ブランク (Method blank) : 目的の分析成分を含まないが、試験試料を分析するために使用されるすべての試薬を含む、すべての試料処理操作に供される物質。分析成分を含まない適切なマトリックスブランクがない場合には、試薬としての水の一定分量がしばしば分析法ブランクとして使用される。』

「2.0 化学分析法の妥当性評価に関する基準及びガイダンス」においては、代替分析法あるいは新規分析法の性能評価をする際には、参照分析法と比較することが適切な場合があるとしている。

『2.2 参照分析法 Reference Method

参照分析法は、それにより代替分析法又は新規分析法の性能を測定又は評価することができる分析法である。化学分析成分については、必ずしも適切な参照分析法が特定又は利用可能ではない。しかしながら、輸出管理規定で使用するために指定された分析法を置き換える場合など、参照分析法の使用が適切である場合がいくつかある。参照分析法の使用が必要かどうか決定する際には、発案試験室と CMVS (化学分析法妥当性評価小委員会 Chemistry Methods Validation Subcommittee) 及びプログラム事務局 (Program Office) 間で協議することを勧める。』

「2.3 性能特性」の項において、『試料調製及び/又は抽出手順/分析法が既存の試験手順から修正される場合、その変更が得られるデータの精度及び精確さに悪影響を及ぼさないことを実証すべきである。修正された方法を実施するために、一般的にはまず初めに標準又は既存の分析法が実施される。その後、既存の分析法と比較することにより、修正された方法の性能が検証される。』とし、以前に妥当性評価された分析法に対して、試料調製法及び抽出手順の変更は慎重に行う必要があり、変更する場合には既存の分析法との比較により修正後の分析法の性能を担保することが求められている。

分析結果の確認方法については、例示として、質量スペクトルのフラグメンテーションパターン、あるいは独立した分析法の結果との比較による実証必要としている。

『2.4 同定の確認 Confirmation of Identity (抜粋)

各分析成分の同定の確認は、規制施行のための分析法妥当性評価の一部として、定性及び定量分析法の両方について検証されなければならない。明白な同定の確認は、通常、妥当性評価対象の新規分析法の適用範囲内の各分析成分の主要な特徴を、例えば質量スペクトルフラグメンテーションパターンによるか、又は独立した分析を用いて得られた結果と一致していることを実証することにより、分析的に確認することを必要とする。』

本ガイドラインでは「限度試験 (Limit Tests)」の考え方を示している。限度試験はスクリーニング法の一つであるが、一般のスクリーニング分析が任意の濃度の分析成分の有無を判定することを目的としているのに対して、限度試験では、分析成分が懸念レベル (基準値など) 付近又はその上の濃度で存在するかどうかを判定することが目的である。

限度試験スクリーニング法を活用することにより、検査において、先ず限度試験で多数の試料を迅速にスクリーニングし、そのうち偽陽性試料についてのみ更に定量分析法又は確認分析法を行うことで、より効率的な検査が可能となると思われる。

『3.4 限度試験（一般的な半定量的スクリーニング法） Limit Tests (common semi-quantitative screening method)

定性分析法の1つの特定のカテゴリーとして、定義済みの懸念レベルを有する分析成分に対する限度試験（バイナリ試験又はパス/フェイル試験）がある。これらのスクリーニング法の目的は、分析成分が懸念レベルの近く又はその上の濃度で存在するかどうかを判定することである。これは、任意のレベルで分析成分の有無を判定することを目的とするスクリーニング法とは対照的である。限度試験妥当性評価は、懸念レベルにおける分析成分についての分析法の精度の測定を含まなければならない。

限度試験スクリーニング法は、一般に、分析結果の5%未満の偽陰性率を有する偽陰性を避けることが望ましい。偽陽性の発生は、推定的な陽性が定量的分析法又は確認分析法によって更に分析されるので、あまり重要ではない。しかし、不必要な確認分析を回避するために、偽陽性率は通常10～15%未満である事が望ましい。理想的には、限度試験は多数の試料を迅速にスクリーニングして、追加の分析の必要性を最小限にすることができる。限度試験スクリーニング法で用いられる一般的なアプローチは、信頼区間を用いて試験室の閾値又はカットオフ値を設定することにより、その値より上の応答のみが更なる試験を必要とするようにすることである。機器応答に基づく限度試験の場合、閾値又はカットオフ値は、応答の標準偏差又は懸念レベルの分析成分を添加した試料中の分析成

分濃度の推定値に基づいて、信頼限界により決定することができる。

例：

乳試料(n=21)が、懸念レベル(10 ng/mL)のスルファメタジンを添加された。LC-MS/MS 限度試験スクリーニング法が、抽出された乳試料中のこの薬物を測定するために用いられた。平均検出濃度は 10.99 ng/mL で、標準偏差は 2.19 であった。10 ng/mL 以上のスルファメタジンを含む試料の95%が閾値を超える応答を有するように、閾値又はカットオフ値が算出された：

$$\begin{aligned} \text{閾値} &= [\text{平均濃度} - (t * \text{標準偏差})] \\ &= [10.99 - (1.725 * 2.19)] = 7.21 \text{ ng/mL} \end{aligned}$$

ここで、t は 95%信頼水準における自由度 n-1 の片側スチューデントの t 値

このアプローチは、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 又は光学的バイオセンサアッセイなどの免疫吸着アッセイにも用いることができる。これらの試験は非競合的(分析成分応答の直接測定)又は競合的(間接測定)であっても良い。競合的免疫吸着試験からのデータの分析は、観察された応答が分析成分濃度の増加と共に減少するという事実を説明しなければならない。従って、閾値又はカットオフ値より低い応答は、推定上の陽性応答とみなされる。免疫吸着アッセイでは、ブランクマトリックス試料について観測される応答を測定し、ブランクの応答が閾値の応答と(統計学的に)区別可能であることを検証することも重要である。

限度試験の性能特性：

新規限度試験の妥当性評価は、最低限、以下の性能特性の評価を含むことが望ましい：感度、特異性、精度、閾値又はカットオフ値、偽陽性率、偽陰性率、最小検出濃度(閾値/カットオフ値より低くすべきである)、及び堅牢性/頑健性。』

また、用語集のうち理解に役立つ部分を以下に

抜粋した。

『付録 1－用語集

同定の確認 Confirmation of Identity: 質量分析などの非常に特異的な手法、又は2つ以上の独立した分析結果の一致を実証することによる分析成分の明確な同定。

実残留試料 Incurred Samples: 試験室添加から由来するものではなく、外因性暴露又は内因性起源などの発生源に由来する対象の分析成分を含む試料。外因性暴露は、例えば農薬使用、動物による摂取、又は環境曝露を含む。

内標準 Internal Standard: 分析成分の定量を容易にするために、分析の特定の段階で既知量で試料に添加される化学物質。内標準は、マトリックス効果、不完全な添加回収率などを修正するために用いられる。分析成分濃度は、その応答を内標準により生成された応答と比較することにより推定される。内標準は、分析成分に類似の物理化学的性質を有するべきである。

分析法妥当性評価 Method Validation: 分析法がその意図された目的に適していることを実証又は確認するプロセス。妥当性評価は、精確さ、精度、特異性、検出限界、定量限界、直線性、適用範囲、堅牢性及び頑健性などの性能特性を実証することを含む。

分析法検証試験 Method Verification: 試験室が許容可能なレベルで妥当性評価された分析法を再現できることを実証するプロセス。』

(4) オーストラリア

1) Veterinary Manual of Requirements and Guidelines - Vet MORAG: Part 5A - Residues⁵⁾

本ガイドラインは、動物用医薬品申請に関する要求事項に関するものであるが、規制のためのモニタリング分析法に関連する事項についても触れ

られており、関連する事項についてまとめた。

「3. 薬物動態及び残留評価の原則」の「MRLの決定 Determination of MRLs」において、検討に当たっては、日常モニタリングでの使用に適する分析検出法の利用可能性についても考慮することが求められている。

『**MRLの決定 Determination of MRLs:** 各組織の総残留に対する指標残留の比は、1日のフードバスケット中の残留物の総量の計算(EDIによって反映される)に使用され、MRL案が勧告された場合に、EDIがADIを超えないことを検証するために使用される。EDIがADIを超える場合、MRL案は勧告されず、(より低い)MRL案を用いてさらに評価を繰り返す。

MRL勧告前に、動物用医薬品の適正使用規範(Good Practice in the Use of Veterinary Drugs: GPVD)に従い、動物用医薬品を使用後に食品に残ることが予想される残留濃度、及び日常モニタリングでの使用に適する分析検出法の利用可能性についても考慮する。これらの要因を考慮した後、得られたMRLは、最大許容残留濃度(許容食事暴露より推定)より低いことはあっても決してこれを超えることはない。

場合によっては、動物用医薬品のMRLの設定は必ずしも必要とされない場合がある。このような場合の動物用医薬品及びその使用パターンはMRL基準の表5に含まれている。』

「4. 一般的な指示」の「4.4. 申請様式」では、動物用医薬品の申請に必要な要求事項として、「分析法」も含まれており、薬物動態及び残留動態試験並びに指標残留減衰試験に使用された分析法及び妥当性評価データの要約の提出が求められている。提出すべきデータの内容については、「5. 残留データ要求事項」の「5.4. 分析法」に示されて

おり、申請者は指標残留を決定するために使用された(妥当性評価された)分析法の詳細を報告することが求められている。分析法の詳細には、「組織抽出液の調製及び精製」が含まれており、規制のための試験法を開発する際の重要な情報になると思われる。

『5.4. 分析法

申請者は、以下の試験で使用され、妥当性評価された分析法の完全な詳細を提出しなくてはならない。

- ・ 薬物動態及び残留動態試験
- ・ 休薬期間(Withholding Period: WHP)推定のために実施される試験において指標残留を決定するための分析

分析法の詳細については、最低限以下の内容を含めなくてはならない。

- ・ 目的及び適用範囲
 - ・ 試薬
 - ・ 機器
 - ・ 試料の収集
 - ・ 試料の保管
 - ・ 試験室試料の調製
 - ・ 組織抽出液の調製及び精製
 - ・ 残留物の定量手順
 - ・ 標準化の方法などの結果の計算方法、検量線の使用(数学的モデル、パラメータ、測定範囲)
 - ・ 精度管理(内部)
- (以下略)』

2) Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods⁶⁾

動物用医薬品の申請の際には、日常的なモニタリング及び規制施行のための分析法を提出すべきであることが以下のように「緒言」の項で示されて

いる。

『緒言 Introduction

本ガイドラインは、動物用医薬品を登録する際に、残留分析法を開発するか/又は使用する分析化学者の実践的な支援を提供するために作成されたものである。動物用医薬品の性質上、多くの農薬に用いられている多成分分析法を使用できないことが多い。これは、動物用医薬品の物理化学的特性がクラス間で大きく異なり、場合によっては、たとえ同じクラスに属していても個々の化合物間で大きく異なるためである。このような違いにより、比較的単純なバイオアッセイや免疫学的試験から複雑な機器分析まで、多様な分析技術の利用が必要とされる。残留動物用医薬品の同定及び定量にどの分析法が適合するかは、分析法の意図する目的に依存する。

申請には、日常的なモニタリングのための分析法と規制施行のための分析法を含めるべきである。場合によっては、この分析法は、MRL(最大残留基準値)の設定を申請するために実施される試験において、残留物を定量するのに用いられる方法であるかもしれない。その他、規制目的に別の分析法が要求される場合がある。』

分析法の中で、バイオアッセイについては、現在も多数の試料をスクリーニングするのに重要であるが、一般に、これらの方法は、規制目的の定量データの作成には適さないとしている。一方、機器分析法は、その特異性及び感度が十分であれば、新規抗菌剤の機器定量の方がバイオアッセイやイムノアッセイによる定量よりも好ましいとしている。バイオアッセイ、イムノアッセイ及び機器分析法のどれを選ぶかは、検討目的などの状況により判断するが NRA (National Registration Authority オーストラリア政府登録局) では、特異性が高く定量可能な

機器分析法を推奨する、としている。以下に該当部分を抜粋した。

『分析法の種類 Types of Analytical Methods』

現在、残留動物用医薬品の定量に利用できる分析法は次の通りである。

・バイオアッセイ Bioassays: オーストラリアでは、尿、乳及び腎臓中の抗菌剤の有無を日常的にスクリーニングするため、広域スペクトルバイオアッセイが広く用いられている。バイオアッセイは、現在も阻害物質の有無について多数の試料をスクリーニングするのに重要である。一般に、これらの方法は、規制目的の定量データの作成には適さない。動物用医薬品、特に抗生物質の残留を定量するために、特定のバイオアッセイ又はイムノアッセイが用いられる。

・機器分析法 Instrumental methods: GLC や HPLC は、様々な検出器と組み合わせて、ほとんどの動物用医薬品の日常分析及びその残留物の同定・定量の両方に用いられる。機器分析法の特異性及び感度が十分であれば、新規抗菌剤の機器定量の方がバイオアッセイやイムノアッセイによる定量よりも好ましい。

・その他の機器分析法 Other instrumental methods: 走査型 TLC や分光法などの機器分析法は、残留動物用医薬品の定量に用いることはあまり一般的ではない。

バイオアッセイ、免疫学的試験及び機器分析法のどれを選ぶかは、それぞれの分析法が目的の作業に適合しているかどうかによる。どの分析法が適切かは状況により判断する。NRA では、特異性が高く定量可能な機器分析法を推奨する。』

「分析法の目的」の項において、動物用医薬品の機器分析法を開発する際の方針が示されており、重要な方針の一つとして、実証済みで許容可能な

抽出効率を有する、ことが示されている。

『分析法の目的 Objectives Of Analytical Methods』

動物用医薬品の機器分析法を開発する際には、以下の方針が重要であり、これらを満足させるべきである。

- ・ 実証済みで許容可能な抽出効率を有する。
- ・ 残留定義に含まれるすべての成分を測定(同定及び定量)する能力を有する。
- ・ 妨害物質が定量限界(LOQ)の 30%を決して超えないような十分な特異性を有する。
- ・ 許容可能な精度及び真度を有する。
- ・ 登録申請の対象となり得るすべての動物種を網羅する。
- ・ 登録申請に関連する組織及び食品(筋肉、肝臓、腎臓、脂肪、卵、乳及びはちみつなど)に適用される。

バイオアッセイ及びイムノアッセイの場合、上記目標のうち関連するもののみ満足させる必要がある。』

更に、「分析法の開発」の項において、分析法開発の際に考慮すべき事項が示されているが、このうち分析法を開発する際に参考になる事項を以下に抜粋した。

① バイオアッセイは、残留に関して多数の試料のスクリーニングには適しているが、一般に、MRL 設定の目的には受け入れられない。機器分析法が用いられる場合、残留の定義は、測定された部分構造(moiety/moieties)、即ち親化合物及び/又は1つ以上の代謝物に基づくべきである。特定の状況によっては、残留の定義は、親化合物及び/又は代謝物を他の誘導体に化学変換して測定する必要がある。

② 分析法の抽出効率は、真の分析成分濃度を測定するための重要な要素であることから、実残

留試料を用いて決定する必要がある。分析法は、放射性標識試験のための試料の分析によって、又は実残留試料を異なる溶媒及び/又は緩衝液の組み合わせを利用して一連の徹底抽出をすることによって実証された抽出手順を採用すべきである。前者については、分析法の開発に放射性標識薬剤を用いた代謝試験と関連付けるのも一つの手段である。

- ③ ジェネリック動物用医薬品に関する申請に用いられる分析法の抽出効率についても、検討し実証する必要がある。これは、食品分析技能評価スキーム (Food Analysis Performance Assessment Scheme : FAPAS) や政府残留調査 (National Residue Survey : NRS) プログラムのような技能試験プログラムを通じて、既存の分析法と同等であることを実証することで達成可能である。
- ④ ジェネリック動物用医薬品のための分析法を開発する必要がある申請者は、可能であれば、先ず MRL 設定に使用された抽出手順及び溶媒と同じものを使用することが望ましい。あるいは、Codex 又は公表された分析法をガイダンスとして使用できる場合がある。このような検討には、徹底抽出及び/又は異なる溶媒を使用したときの抽出効率の比較が含まれる。
- ⑤ 分析法の感度は、意図する目的に適合するものでなくてはならない。例えば、MRL がすでに設定されている場合や輸出入に関係しない場合は MRL の 1/2 又はそれ以下の濃度を検出する感度が必要である。しかし、データが MRL 又は WHP (休薬期間) のいずれかを変更する根拠として、あるいは ESI (Export Slaughter Intervals 輸出向けと畜保留期間) の設定に用いられる場合、分析法は MRL の 1/2 未満の濃度の残留物を検出する必要がある (通常 LOQ 又は LOD ま

での残留物が報告される)。

- ⑥ 回収率データは、試験試料中で生じる残留濃度の範囲全体にわたって作成する必要があり、最低限、LOQ 及び提案された MRL での回収率を含めるべきである。分析法を妥当性評価するためには 1 濃度のみの回収率では不十分である。内標準を使用する分析では、分析成分と内標準の両方の回収率データを提供しなくてはならない。
- ⑦ バイオアッセイ及びイムノアッセイは、特異性を判定し、残留の定義に見合う定量を実証するために、機器分析法と比較する必要がある。バイオアッセイ及び/又はイムノアッセイが残留の定義を定量できない場合、登録目的の残留データの作成には適さない。

上述したように、分析法開発に当たっては「抽出効率」に関する検討が必須であり、検討結果の詳細を報告することが「分析法の報告」の項に明記されている。該当部分を抜粋した。

『**分析法の報告 Reporting Of Analytical Methods** 以下の情報を報告すべきである。

1. 装置及び機器の詳細、使用した試薬類、試料調製、抽出及びクリーンアップ手順、並びに分析成分の定量を含む分析法の完全な説明。
2. 生データを含む妥当性評価結果の完全な詳細。
3. 検討された試験系及び/又は使用した溶媒を含む、抽出効率に関する試験の詳細及びその結果。
4. 代表的なクロマトグラム。提出すべき最低限の情報は、標準品、未処理試料、添加した未処理試料、及び薬剤投与動物から採取した各マトリクスについての試料である。』

3) Australian Government, Australian Pesticides

and Veterinary Medicines Authority, Analytical Methodology⁷⁾

本ガイドラインは「International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products guideline (VICH* GL)49(動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力ガイドライン (VICH GL)49)⁸⁾に基づいている。VICH GL 49 は、残留動物用医薬品の定量分析法に関して、オーストラリアのほとんどのガイドラインの内容をカバーしているが、これとは別にオーストラリア独自の追加の検討事項についても含まれている。本ガイドラインは、前出の「Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods⁶⁾」と重複する部分がある。以下に、分析法開発に関連する事項を抜粋した。

『1. 残留分析法に関するガイダンス

本ガイドラインは、動物用医薬品の残留分析法(指標残留減衰試験で残留を測定するために開発された分析法)の評価のために開発された分析手順のみに使用されることを意図している。規制目的のモニタリング検査手順の妥当性評価に必要な評価基準を規定することは意図していない。』

『1.1. 緒言

残留データは、最大残留基準値の設定、既存の最大残留基準値に適合していることの実証、適切な休薬期間の決定及び輸出向けと畜保留期間の判断に用いられる。食糧生産動物種の内部又は表面に投与される動物用医薬製品の登録を裏付ける残留データに加え、残留データの作成に使用された分析法を提供する必要がある。

動物用医薬品のための分析法を開発する場合、分析法は以下のようにすべきである。

- ・ 残留の定義又は指標残留に含まれる全成分を測定(同定、定量及び確認)する能力を有する。

- ・ 妨害物質が分析定量限界の 30%を決して超えない十分な特異性を有する。
- ・ くり返し性(併行精度)が示されている。
- ・ 薬剤が投与された動物から得られるすべての組織又は食品をカバーする。』

「1.2. 分析法の種類」の項において、残留動物用医薬品の定量に用いる分析法は、バイオアッセイや免疫アッセイよりも機器分析法の方が望ましいとしている。以下に概要をまとめた。

- ① バイオアッセイは、現在も多数の試料中の阻害物質をスクリーニングするのに重要であるが、規制目的の定量データの作成には適さない。
- ② 機器分析法は、ほとんどの動物用医薬品の日常的な分析及びそれらの残留物の確認及び定量の両方に使用でき、機器分析法の特異性及び感度が十分であれば、新規抗菌剤の機器定量は、バイオアッセイや免疫アッセイによる定量よりも好ましい。
- ③ 走査型薄層クロマトグラフィーや分光法などの分析法が残留動物用医薬品の定量に用いられる頻度は低い。
- ④ 分析法の選択は、目的の作業に適合しているかどうかによるが、APVMA では特異性が高く定量可能な機器分析法を推奨する。

「1.3. 分析法の目的」の項において、動物用医薬品の機器分析法を開発する際には、実証済みで許容可能な抽出効率を有することが求められている。

「1.4. 分析法の開発」の項では、分析法の開発において考慮すべき事項が示されており、以下に分析法開発に関連する部分を抜粋した。

- ① バイオアッセイは、多数の試料について残留を

スクリーニングすることは許容可能であるが、一般に、最大残留基準値を設定する目的には受け入れられない。機器分析法を使用する場合、残留の定義又は指標残留は、残基(moiety)又は測定された残基(すなわち、親化合物及び/又は1つ以上の代謝物)に基づくべきである。ある特定の状況によっては、残留の定義や指標残留は、親化合物及び/又は代謝物を他の誘導体に化学変換して測定する必要がある。

- ② 分析法の抽出効率、真の分析成分濃度を測定するための重要な要素であることから、実残留試料を用いて決定されるべきである。分析法は、放射性標識試験のための試料の分析、又は実残留試料の連続抽出に異なる溶媒及び/又は緩衝液の組み合わせを利用した一連の徹底抽出により実証された抽出手順を採用すべきである。分析法の開発に、放射性標識薬剤を利用した代謝試験と関連付けることは、前者を達成するための1つの手段である。
- ③ ジェネリック動物用医薬品に関連する申請に用いられた分析法の抽出効率についても、検討して実証すべきである。これは、国家残留調査プログラムなどの技能試験プログラムを通じて、既存の分析法と同等性を実証することによって達成できる。
- ④ ジェネリック動物用医薬品の分析法を開発する必要がある場合、可能であれば、先ず最大残留基準値の設定に使用された抽出手順及び溶媒と同じものを使用することが望ましい。あるいはまた、コーデックス委員会で出版された方法又はその他の出版された分析法をガイダンスとして使用できる場合がある。このような検討には、徹底抽出及び/又は異なる溶媒を使用したときの抽出効率の比較が含まれる。マトリックスから残留物を放出するための他の方法の使用についても

検討すべきである(例:組織からネオマイシンを放出させる過塩素酸の使用、抱合体残留物から遊離させるグルクロニダーゼの使用、タンパク結合残留物を放出させるプロテアーゼの使用)。

- ⑤ 分析法の感度は、意図した目的に適合すべきである。留意点として、最近では、モニタリングや監視を行う試験室において、タンデム質量分析計付き液体クロマトグラフィーによる検出法が日常的に用いられており、最新の分析法は同等の選択性と感度を有する必要がある。データが最大残留基準値又は休業期間のいずれかを変更する根拠、あるいは輸出向けと畜保留期間の設定の根拠として用いられる場合、分析法はその定量限界/検出限界濃度で残留を検出できる必要がある。さらに、試験室は、残留データの統計解析を補足するために分析法の検出限界と定量限界の間の値を定量し測定値を報告することが求められる。
- ⑥ 試験試料中に生じる残留濃度の全範囲を網羅する回収率データを作成すべきであり、最低でも、定量限界及び最大残留基準値(案)での回収率を含めるべきである。分析法を妥当性評価するためには、1濃度のみの回収率データでは不十分である。内標準を使用する分析では、分析成分と内標準の両方の回収率データを提示すべきである。
- ⑦ バイオアッセイ及びイムノアッセイは、特異性を判断し、残留の定義の定量が同等であることを示すために機器分析と比較する必要がある。バイオアッセイ又はイムノアッセイが残留の定義を定量できない場合、登録目的のための残留データの作成には不適當である。

分析法開発では、分析法の抽出効率は重要な要素であることから、「1.5. 分析法の報告」の項に

においては、試験系及び/又は使用した溶媒を含む、抽出効率に関する試験の詳細及び結果の報告が求められている。

(5) コーデックス委員会

Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (CAC/GL 71-2009)¹¹⁾

本ガイドラインの中で残留規制のための分析法について規定している部分についてまとめた。

食品中の残留動物用医薬品に関する分析法は、対象とする分析成分を確実に検出し、その濃度を定量し、そして分析成分を正確に同定しなくてはならない。そのために、残留規制プログラムに使用される分析法を、目的に応じて、分析法が単に対象残留物の存在を検出する(スクリーニング分析法)か、定量する(定量分析法)か又は確認する(確認分析法)かの3つのカテゴリーに分類している。これらの3つのカテゴリーの分析法(スクリーニング、定量及び確認分析法)は、残留規制プログラムでは、連続して用いられる可能性がある。

スクリーニング分析法で「陽性」の試料は疑わしい(偽陽性)とみなされ、通常、試料が MRLVD (Maximum Residue Limit for Veterinary Drugs: 動物用医薬品の最大残留基準値)を超過しているかどうかを確定するために、さらに定量分析法及び/又は確認分析法が適用される。一般に、定量分析法や確認分析法よりもスクリーニング分析法の方が簡便で迅速な方法であることから、スクリーニング分析法を使用して、全試料の中から偽陽性試料のみを選択し、さらに定量分析や確認分析を行うことにより、より効率的な検査が可能となる。ただし、分析値の確定には定量分析法及び/又は確認分析

が必須であるため、スクリーニング分析の単独使用はすべきでないとしている。以下にスクリーニング、定量及び確認分析法についてのガイドラインの規定を抜粋した。

『139. スクリーニング分析法は、その性質上、定性又は準定量的であり、MRLVD 又は管轄当局により設定された他の規制値を超える残留物を含有する可能性のある一群の動物又はロットから採取された試料の存在(又は不在)を特定するスクリーニング分析法として用いられる。これらの分析法は、存在する濃度の正確な測定や残留物の構造確認を行うものではないが、どの物質についてさらに検査すべきか、又はどれが免除可能かを迅速に判断するために用いられる。これらの分析法は、試料中に規制値を超える残留物が含まれているかどうかを決定するために、フードチェーンに入る時点、検査施設又は試験室での試料の受領時に適用される。このような分析法は、通常、より高い分析効率を提供し、非試験室環境で実施できる場合があり、規制管理プログラムでの使用においては、試験室内で行われる検査よりも安価と考えられる。スクリーニング分析法を使用することにより、この試験を用いて同定された推定陽性(疑い)試料の分析に、試験室資源を集中することが可能となる。これらの分析法(規定された低い偽陰性率を有するべきである)は、MRLVD に適合していない可能性があると特定された試料に適用するために、適切に妥当性評価された定量分析法及び/又は確認分析法がないのであれば、公的な試料に関する残留規制目的では、単独で使用すべきではない。

140. 定量分析法は、ある試料中の残留物が MRLVD 又は他の規制値超過の決定に用いられる定量的情報が得られるが、残留物の同定の明確な確認をすることはできない。このような定量結果を得る分析法は、MRLVD 又は規制措置限界を挟

む分析範囲内において良好な統計管理がなされていなければならない。

141. 確認分析法は、残留物の同定の明確な確認を提供し、またその含有量を確認することもできる。確認分析法は最も決定的な分析であり、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC/MS)などのクロマトグラフィー法及び質量分析法に基づくことが多い。残留物の同定確認に用いられる場合、このような分析法は設定された統計的限界の範囲内で確実な構造情報を示すべきである。確認分析法により定量的情報が得られない場合、元の定量分析法又は適切に妥当性評価された代替の定量分析法を用いて、複製試験試料を分析することにより、元の定量分析法の定量結果を検証すべきである。』

本ガイドラインの「分析法の選択及び妥当性評価のための考慮事項」の「単一試験室妥当性評価-クライテリアアプローチ」の項において、試験室間で妥当性評価された分析法(特に多成分分析法及び新規分析成分)であっても、必ずしも使用可能又は適合可能でないと認識されており、分析法の選択に関する根拠を示すために、単一試験室で分析法の妥当性評価をする場合があるとしている。また、分析法の精確さ(真度及び精度)は、技能試験、認証標準物質、添加回収試験、及び他の妥当性評価された分析法との比較により検証している。

以下に該当部分を抜粋した。

『単一試験室妥当性評価-クライテリアアプローチ

155. IUPAC により技術報告書として、単一試験室における分析法の妥当性評価に関するガイダンス文書、「単一試験室における分析法の妥当性評価に関する調和ガイドライン (Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis)⁶」が発行されている。手

続きマニュアル(Procedural Manual)⁷では、試験室間で妥当性評価された分析法は、特に多成分/多基質分析法及び新規分析成分については、必ずしも使用可能又は適合可能でないと認識されている。そのような場合、分析法の選択に関する一般基準ならびに以下に示す追加の基準を満たすために、単一試験室で分析法の妥当性評価をする場合がある。

(a) 分析法は、国際的に認められたプロトコル(例えば、上記で参照した単一試験室における分析法の妥当性評価)に関する IUPAC ガイドラインなどに従い妥当性評価される。

(b) 分析法の使用を、ISO/IEC 17025 (2005) 規格又は GLP 原則 (Principles of Good Laboratory Practice) に準拠した品質管理システムに組み込む。

(c) 分析法は、以下の例によって示された精確さに関する情報によって補完されるべきである。

- 可能であれば、定期的な技能試験への参加
- 適用可能な場合、認証標準物質による校正
- 分析成分の予測濃度で実施された回収試験
- 可能であれば、他の妥当性評価された分析法による結果の検証

⁶ Thompson, M., Ellison, S.L.R. & Wood, R. (2002) Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. Pure and Applied Chemistry 74: 835-855.

⁷ FAO/WHO コーデックス委員会手続きマニュアル(Procedural Manual)』

「分析法の開発における検討事項」の項では、分析法を開発するにあたり、検討すべき基本的な事項について示している。以下に該当部分を抜粋した。

『分析法の開発における検討事項

158. 分析法の開発には、用いられる分析技術に

熟練した分析者、ならびに適切な試験室空間、装置及び経済的支援を必要とする。分析法の開発を開始する前に、要求される性能パラメータを含む、残留規制プログラムにおける分析法の使用目的及び必要性を設定すべきである。他の検討事項には、分析法の要求される適用範囲（対象とする化合物又は化合物の種類及び試料の種類）、予測される干渉物質、測定系に要求される性能特性、分析法の性能に影響すると考えられる関連する物理化学特性、望ましい試験系の特異性及びその判定方法、分析成分及び試薬の安定性データ並びに試薬の純度、分析法の性能因子を満たすために許容される操作条件、試料調製ガイドライン、分析法の性能に影響する可能性のある環境要因、安全上の配慮事項、及びプログラムのニーズに関連するその他の特定の情報などがある。特に、通常の保存及び使用条件下並びに試料処理中の両方の条件における標準物質の安定性を評価すべきである。確認を目的とした再分析の可能性に備えて保留されている期間を含む、分析前の試料の一般的な保存条件における試料中の分析成分の安定性についても決定すべきである。

159. 分析法の性能属性を確立することは、公衆衛生プログラムの策定及び管理に必要な情報を食品安全に関する機関に提供するという点で不可欠である。また、分析法の性能属性は、将来の計画、評価及び製品の処理において良好な管理の決定根拠ともなる。動物医療業界にとっては、分析手順の開発において達成しなくてはならない性能を正確に知るためのガイドラインとなる。十分に規定された分析法の性能因子を有することは、全関係者に有益なものとなる。分析法の性能要件は、最大残留基準値が設定されている残留物のスクリーニング、定量又は確認に使用される分析法か、あるいは ADI 及び MRLVD が提案されていない残留

薬剤の分析法かによって異なる。後者の場合、管轄当局は、規制管理目的で使用される分析法が満たさなくてはならない最低性能基準を設定することができる。しかしながら、これらの化合物の食品中の安全な濃度が設定されていない場合、管轄当局は、技術及び分析能力の向上が反映されていることを確認するために、そのような基準を定期的に見直すことができる。このような基準が管轄当局によって正式に設定されていない場合、通常は規制試験室で用いられる分析法の検出能によって事実上設定される。』

分析法の精確さ (Accuracy) の決定方法については、セクション 167 において示されており、精確さは、① 認証標準物質の分析、② 性能パラメータがすでに厳密に確立されている他の分析法（一般に、試験室間試験で妥当性評価された分析法）により得られた結果との比較、③ ①及び②がない場合は添加回収試験により決定される。一般に、認証標準物質及び試験室間試験によって妥当性評価された分析法の両方とも使用できないことが多いため、添加回収率として精確さを決定することが、食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の妥当性評価に頻繁に用いられる、としている。しかし、回収率の解釈では、試料に添加された分析成分は、生物学的に生じた実残留試料の同じ分析成分と同じ挙動を示さない可能性があることを認識する必要があるとしている。以下に該当部分を抜粋した。

『167. 分析法の精確さ Accuracy は、認証標準物質の分析により、又は性能パラメータがすでに厳密に確立されている他の分析法（一般に試験室間共同試験が行われた分析法）により得られた結果と比較することにより、あるいは認証標準物質や試験室間試験で妥当性評価された分析法がない場

合は、既知のブランク試料に添加された分析成分の回収率 recovery を測定することによって、決定することができる。認証標準物質及び試験室間試験によって妥当性評価された分析法の両方とも使用できないことが多いので、回収率として精確さを決定することが、食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の妥当性評価に頻繁に用いられる。測定値の精確さは、系統誤差 systematic error (分析法バイアス) 及び分析成分の回収率 (回収百分率として測定) と密接に関連する。分析法の精確さに関する要求事項は、試験結果を規制でどのように使用するかにより異なる。精確さは、MRLVD 付近の濃度又は規制措置のための目標濃度 (一般的には、目標濃度の 0.5~2.0 倍の濃度) で、慎重に特徴づけを行い、規定の統計的信頼水準内で規制措置限度を超えることを決定することができる残留物を含有する試料に対してのみ、規制措置が講じられるようにすべきである。

168. 回収率 Recovery は、通常、既知の濃度で試料に添加した後に実験的に測定した分析成分の百分率として表され、分析法の分析範囲をカバーする濃度で評価するべきである。回収率の解釈では、試料に添加された分析成分は、生物学的に生じた実残留試料の同じ分析成分 (残留動物用医薬品) と同じ挙動を示さない可能性があることを認識する必要がある。多くの状況において、抽出される実残留物の量 (収量又は回収率) は、存在する総実残留物量よりも少ない。これは抽出時の損失、残留物の細胞内結合、抱合体の存在、又は分析成分を添加したブランク組織を用いた回収実験では完全には再現されない他の要因によるものと思われる。比較的高濃度では、分析法の回収率は 100% に近づくことが予想される。より低濃度では、特に広範囲の抽出、分離及び濃縮操作を伴う分析法では、回収率はより低くなる可能性がある。観

察される平均回収率に関係なく、必要に応じて信頼性のある補正を最終結果に対して行うことができるように、変動の少ない回収率が望ましい。回収率補正は、コーデックス委員会によって提供されるガイダンスに従って行われるべきである。』

分析法の開発時に得られた分析法のばらつき (精度) は、その分析法を使用する別の試験室で得られるばらつきよりも通常小さく、分析法が開発された試験室で適切な性能基準を達成できないのであれば、他の試験室でそれよりもよくなることは期待できないと明記されている。このことは自明のことかもしれないが、例えば、試験法開発でのすべてのパラメータが分析法の性能基準を満たしている場合であっても、その値がすべて目標値ぎりぎりであるような場合は、他の機関で実施する際に目標値を満たさない可能性があるため、開発時にはできる限り余裕を持った条件設定が望ましいと思われる。

『170. 分析法を開発している試験室で得られる分析法のばらつきは、開発後に分析法を使用する別の試験室で得られるばらつきよりも通常小さい。分析法が開発された試験室で適切な性能基準を達成できないのであれば、他の試験室でそれよりもよくなることは期待できない。』

また、「規制管理プログラムで用いられる分析法の一般性能特性」の項では、分析法は、堅牢 (頑健) で、費用対効果が高く、比較的複雑ではなく、移植性があり、かつ一連の試料を効率的に同時に取り扱うことができるものであるべきである、との考え方を示している。なお、移植性 (Portability) とは、確立された分析性能特性を失うことなく、ある場所から別の場所に移すことが可能であるという分析法の特性である。

また、「残留規制分析法に関する分析法の開発及び妥当性評価の検討事項」において、内標準の使用に関する留意点を示しており、以下に抜粋した。

『内標準の使用

191. 残留分析法は、分析管理のための内標準を用いて設計されることがある。内標準を正しく使用することにより、分析変動の一部が補正され、精度が向上する。しかしながら、内標準の使用が不適切であれば、分析測定的重要事項である変動要因があいまいになる場合がある。内標準を使用する場合は、操作のできるだけ早い段階で試料に添加すべきであり、分析開始前に試験試料に添加するのが望ましい。内標準は、対象とする分析成分の回収率を、一定の、そして、予測可能な形で反映しなくてはならない。分析法において、対象となる分析成分の挙動を反映しない内標準は、最終結果の計算で重大な誤差を招く。内標準を選定する際は、内標準が対象の分析成分の回収率を変更したり、測定過程に干渉したりすることがないように注意しなければならない。分析法に対する内標準の影響の程度及び予測可能性を知ることが重要である。内標準は、適切に使用されると分析法の性能を大きく向上させることができる。』

(6) OECD

OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 503: Metabolism in Livestock¹⁰⁾

本ガイドラインの中で分析法に関連する部分についてまとめた。

「試験の実施」の「一般的な考慮事項」においての『7. 申請者は、最大残留基準値(MRL)案に将来影響を及ぼす可能性のある新規で予期しない農薬の代謝物が存在する可能性に常に注意すべ

きである。代謝物又は変質生成物の構造が、別の登録済みの農薬と同一で、その情報が公開されている場合、申請者はその旨を明記すべきである。』とし、代謝試験が将来の規制対象化合物の選択に重要な役割を担っていることを示唆している。

また、「家畜における残留の特徴」の項では『17. 家畜代謝試験の実施中、申請者は、MRL/許容値又は食事リスク評価の目的のために定義された残留物を効率的に抽出するための分析法(規制施行及びデータ収集)の能力に関して、発生する可能性のある将来の問題を念頭に置く必要がある。好ましくは、肝臓及び乳の試料を用いるべきであるが、特定の代謝物が特定の臓器に蓄積する場合、当該臓器の試料も保存すべきである。従って、放射性標識された試料は、後に開発される分析法による将来の分析(ときに分析法の「ラジオバリデーション」と呼ばれる)のために保存する必要があると考えられる。しかし、分析法の抽出手順が放射性標識試験で用いられたものを反映する場合、そのようなデータは一般的に必要なものであろう。』とし、代謝試験の段階から、将来の規制対象化合物を効率的に抽出するための分析法について留意することが求められている。加えて、将来の規制分析法のラジオバリデーションによる評価のために、代謝試験で得られた放射性標識された試料の保存についても求められている。

本ガイドラインの「分析段階」では『37. 新たな抽出及び分析手法の使用が、上記の手法に代わるものとして利用するのに適切な場合がある。超臨界流体抽出法 supercritical fluid extraction (SFE)、マイクロ波抽出法 microwave extraction、高速溶媒抽出法 accelerated solvent extraction (ASE)などの代替抽出法を用いることができる。いずれの場合も、代謝経路を完全に解明するためには、利用可能な最善の技術を用いるべきである。』としている。し

かし、この規定はあくまで代謝経路の解明のための手法と理解される。諸外国では、別途、残留規制のための分析法の提出も求めていることから、あまり問題になることはないと思われるが、規制対象化合物を選択するための試験で用いられた主要な分析法が、上記のSFE法やASE法などのように必ずしも規制分析において汎用されているとはいえない手法であった場合には、そのままでは規制分析法に適用することは困難と考えられる。特に、抽出法を変更しようとする場合には注意が必要である。なお、農林水産省の動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン²⁾では「残留基準値の濃度で、指標残留を分析するための実用的な分析方法がある。」ことが求められている。分析法は常に進歩していると認識されるが、新たな手法が一般に受け入れられ利用できるようになるまでにはある程度の時間がかかる事を念頭に置いて、できる限り汎用性の高い試験法の開発が望まれる。

2. 分析法の評価基準について

B. 研究方法で示したガイドライン等について、分析法の評価基準に関して記載があるものについて整理した。

(1) 農林水産省(日本)

12 動薬 A 第 418 号農林水産省動物医薬品検査所長通知(平成 12 年 3 月 31 日付け、一部改正平成 30 年 2 月 28 日 29 動薬第 3867 号)の「別添 2 動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン等」の「14 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン」²⁾

分析法の評価基準については、本ガイドラインの 14-5 に記載されており、以下に抜粋した。

「14-5 食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験:残留試験において使用される分析方法のバリデーション

(VICH GL49R)」

動物用医薬品の残留農薬分析法の評価基準に関連する事項を以下抜粋した。

(3) 分析能パラメータ

通常、分析方法のバリデーションには、特定の分析能パラメータがある。それらの分析能パラメータは、以下のように定義される:

- 直線性 (Linearity)
- 真度 (Accuracy)
- 精度 (Precision)
- 検出限界 (Limit of Detection)
- 定量限界 (Limit of Quantification)
- 選択性 (Selectivity)
- 基質中での安定性 (Stability in Matrix)
- 処理試料中の安定性 (Process Sample Stability)
- 頑健性 (Robustness)

各パラメータは、動物用医薬品の残留減衰試験での使用を意図した分析方法のバリデーションに適用されるもので、以下のとおり規定される。

ア 直線性 (Linearity)

予測される基質(組織、乳、卵又は蜂蜜)中濃度の範囲内で、直線関係を評価するための検量線を作成しなければならない。標準品の検量線は、溶媒又は緩衝液中の標準品、対照基質の抽出物に添加された標準品及び対照基質に添加され、抽出過程を経た標準品の3つの方法で作成することができる。直線性については、少なくとも5水準の濃度を使用し、既知濃度に対する反応を、線形、多項式又は他の(適切な)回帰プロットによって示す。重み係数の許容については、残渣がランダムに分布しているか確定するために、3回の分析による残差の評価によって決定しなければならない。残差の評価は、少なくとも独立した3回の分析で行う。

検量線の推奨許容基準は、検量線の算出方法に依存する。対照試料に添加され、前処理過程を経た標準品により作成された検量線では、試料と同じ許容基準が適用される(ウを参照)。溶媒又は緩衝液中の標準品又は対照基質の抽出物へ添加された標準品により作成された検量線では、より厳密な許容基準(併行精度:全ての濃度で 15 % (LOQ 以下は 20 %)が要求される。

直線性を得るために、対数変換を必要とする定量法(例えば、微生物学的定量法)もあれば、用量-反応関係を確立するためにより複雑な関数を用いた計算を必要とする定量法(例:ELISA、RIA)もある。ここでも、選択した関数の「許容」については、その関数を使用した場合の残差の評価によって検証しなければならない。

イ 真度(Accuracy)

分析方法の真度とは、分析対象の濃度の真値と実験過程を経て得られる値の平均値との一致の程度のことである。真度は、系統誤差(分析方法による偏り)及び分析対象の回収率(回収率%として評価される)と密接な関係がある。残留分析方法の推奨される真度は、分析対象の濃度によって異なる。真度は、表 1 に示した範囲に適合しなければならない。

ウ 精度(Precision)

分析方法の精度とは、同一の均質の被験物質から、規定された条件に従って測定して得られた、複数の試験結果の間の一致の程度のことである。異なる施設間の分析のばらつきを室間再現精度と定義し、施設内での反復分析によるばらつきを併行精度と定義する。単一施設のバリデーションの精度には、分析ラン内(併行精度)と分析ラン間の精度を含まなければならない。

バリデーションの過程の中で、分析方法の分析ラン内及び分析ラン間の精度を求めることができる。

多くの場合、分析法を開発する施設と残留減衰試験の試料を分析する施設は同じであるため、通常、残留減衰試験を実施するために、室間再現精度(施設間の精度)を求める必要はない。分析方法の室間再現精度の代わりに、分析ラン内精度を求めることができる。分析ラン内及び分析ラン間精度は、バリデートしようとする範囲(LOQ を含む。)を含む3水準の濃度で、3日間で少なくとも3回ずつ繰り返した分析結果の評価により決定する。

残留分析方法のバリデーションでは、許容されるばらつきは、分析対象の濃度に依存する。精度は、表 2 に示した範囲に適合しなければならない。

エ 検出限界(Limit of Detection)

分析方法の検出限界(LOD)とは、許容される確かさで試験試料中の分析対象を検出可能な最低濃度のことである。LOD を求める科学的に妥当な方法は幾つかあるが、使用する方法的妥当性を示すことができれば、いずれの方法を用いてもよい。付記1及び付記2としてLOD を求めるプロトコルを、付記3として一つの試験で真度、精度、LOD、LOQ 及び選択性を求めるプロトコルを例示した。

オ 定量限界(Limit of Quantification)

分析方法の定量限界(LOQ)とは、規定された真度及び精度で測定可能な分析対象の最低濃度のことである。LOD と同様、LOQ を求める科学的に妥当な方法は幾つかあるが、使用する方法的妥当性を示すことができれば、いずれの方法を用いてもよい。付記1及び付記2としてLOQ を求めるプロトコルを、付記3として一つの試験で真度、精度、LOD、LOQ 及び選択性を求めるプロトコルを例示した。

カ 選択性(Selectivity)

選択性とは、測定する分析対象と測定する試料に共存する他の物質を識別する分析方法の能力

のことである。残留減衰試験で用いられる分析方法では、選択性は、主に測定する試料中の内因性物質について規定される。残留減衰試験は、十分に管理されており、その他の投与物質(すなわち、他の動物用医薬品又はワクチン)は予めわかっているか、試験中の投与が禁止されている。バリデートされた分析方法を残留規制の分析方法として提出する必要がある場合、試験実施者は、供試動物に使用される既知の物質について試験し、想定される分析への妨害の有無を確認するとよい。

分析方法の選択性の適切な尺度は、ブランク試料の反応である(オを参照)。対照試料の反応は、LOQ での反応の 20 %以下としなければならない。付記3として一つの試験で真度、精度、LOD、LOQ 及び選択性を求めるプロトコルを例示した。

キ 基質中での安定性(Stability Matrix)

残留減衰試験から採材した試料(組織、乳、卵又は蜂蜜)は、通常、分析するまで凍結保存する。予定される保存条件下で、過度の減少なしに試料を保存できる期間を、分析前に明らかにする必要がある。適切な保存条件(4℃、-20℃及び-70℃)及び分析前に試料を保存できる期間を明らかにするために、バリデーションの一部又は別の試験として、安定性試験を実施する必要がある。

試料に既知量の分析対象を添加し、適切な条件下で保存する。試料は規定した間隔(例:開始時、1週目、1か月目、3か月目)で分析する。試料を凍結する場合には、凍結融解試験(1日1回の凍結及び解凍の繰り返しを最低3回)を実施する。また、保存開始時の濃度を決定する初期試料として、投与動物試料を用いることができる。基質中での安定性の評価のため、バリデートされた範囲の最高と最低付近の2水準の濃度で分析を行うプロトコルが推奨される。規定した保存時点で得た平均濃度が、イで規定された真度の許容範囲以内で、

保存開始時の試料の分析結果又はブランク試料に新たに分析対象を添加した試料の分析結果と一致する場合、基質中での安定性は許容される。

ク 処理試料の安定性(Processed Sample Stability)

試料処理の翌日に定量すること又は機器の故障のため何日か保存することはよくある。処理試料の保存条件下での安定性を明らかにするため、必要であれば、処理試料の抽出物中の分析対象の安定性を検討する。室温で4~24時間及び4℃で48時間が、保存条件の例として考えられる。処理方法により、その他の保存条件を検討する。処理試料の安定性の評価のため、バリデートされた範囲の最高と最低付近の2水準の濃度で3回の分析を行うプロトコルが推奨される。規定した保存時点で得た平均濃度が、イで確立された真度の許容範囲以内で、処理直後の試料の分析結果又はブランク試料に新たに分析対象を添加して処理した試料の分析結果と一致する場合、処理試料中での安定性は十分である。

ケ 頑健性(Robustness)

残留規制の分析方法では、頑健性の評価は重要である。通常、1つの施設で、同じ機器を使用して実施する残留分析方法では、頑健性の評価は重要ではない。しかし、特に、経時的に変更又は改定が行われる分析方法の要因については、頑健性を評価しなければならない。試薬のロット、インキュベーション温度、抽出溶媒の組成及び容量、抽出時間、抽出回数、固相抽出(SPE)カートリッジのメーカー及びロット、分析カラムのメーカー及びロット並びに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)溶出溶媒の組成が、これらの要因に含まれる。分析方法の開発、バリデーション又は使用において、これらの要因のいずれか又は全てが分析方法に与える影響の程度を明らかにし、分析方法に影響を

及ぼす可能性が最も高い条件での変動について評価しなければならない。

表 1 真度の許容範囲

分析対象の濃度	真度の許容範囲
< 1 µg/kg	- 50% ~ + 20%
≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg	- 40% ~ + 20%
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	- 30% ~ + 10%
≥ 100 µg/kg	- 20% ~ + 10%

表 2 精度の許容範囲

分析対象の濃度	許容される分析ラン内精度(併行精度) %CV	許容される分析ラン間精度 %CV*
< 1 µg/kg	30%	45%
≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg	25%	32%
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	15%	23%
≥ 100 µg/kg	10%	16%

* : Horwitz の式[$CV = 2^{(1-0.5 \log C)}$ C = 小数で表される濃度 (例えば、1 µg/kg は、 10^{-9} として表される。)]により決定。

(2) EU

COMMISSION DECISION 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results³⁾

本ガイドラインで分析法の性能評価パラメータとして、以下の 11 パラメータが示されている。

- 1) 特異性
- 2) 真度
- 3) 安定性
- 4) 回収率
- 5) 併行精度 (繰り返し性)
- 6) 室内再現性
- 7) 室間再現精度 (再現性)

8) 判定限界 (CC α)

9) 検出能力 (CC β)

10) 検量線

11) 頑健性: 軽微な変化又は大きな変化

1. 分析法の開発の方針についての(2) EU の項でも述べたように、定量分析法の真度については、以下のように規定されている。

『2.3.2.1. 定量分析法の真度

認証標準物質の繰り返し分析の場合、実験的に決定された回収率で補正された平均質量分率の認証値からの逸脱に関するガイドラインの範囲は、以下の通りである。

表 2 定量分析法の最小真度

質量分率	範囲
≤ 1 µg/kg	- 50% ~ + 20%
> 1 µg/kg ~ 10 µg/kg	- 30% ~ + 10%
≥ 10 µg/kg	- 20% ~ + 10%

そのような認証標準物質が入手できない場合、測定値の真度は、既知量の分析成分をブランクマトリックスに添加して得られた回収率により評価することが許容される。平均回収率で補正されたデータは、表 2 に示す範囲内にある場合のみが許容される。』

精度のうち室間精度(再現性)については、以下のように目標値が規定されているが、併行精度及び室内精度については、目安が示されているのみで、具体的な値は示されていない。

『2.3.2.2. 定量分析法の精度

再現性条件下での、標準試料又は添加試料の反復分析についての試験室間の変動係数 (coefficient of variation : CV) は、Horwitz 式により算出されたレベルを超えないものとする。Horwitz 式を以下に示す。

$$CV = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

この式において、C は 10 のべき乗 (指数) (例: 1

mg/g = 10⁻³)として表される質量分率である。例を表 3 に示す。

表 3 分析成分の質量分率範囲における定量分析の再現性 CV の例

質量分率	再現性 CV(%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) 100 µg/kg 未満の質量分率については、Horwitz 式を適用すると許容できない高値になる。したがって、100 µg/kg 未満の質量分率の CV は可能な限り低いものとする。

繰り返し条件下で行われる分析については、室内 CV (訳者注: 併行精度) は、一般に上記の値の 2 分の 1 から 3 分の 2 の範囲にあると考えられる。室内再現性条件下で行われる分析については、室内再現性 CV (訳者注: 室内精度) は室間再現性 CV (訳者注: 再現精度) を超えないものとする。許容限界が設定されている物質の場合、分析法は許容限界の 0.5 倍の濃度で対応する室間再現性 CV を超えない室内再現性を達成するものとする。』

本ガイドラインでは判定限界 (CC α) 及び検出能力 (CC β) の概念を規定している。CC α は、 α (許容基準が設定されている場合: 1 %, 許容基準が設定されている場合: 5 %) の誤差をもって偽陽性となる濃度であり、CC β は β (5 %) の誤差をもって偽陰性となる濃度を表している。以下に該当部分を抜粋した。

『3.1.2.5. 判定限界 Decision Limit (CC α)

判定限界は、「分析法の性能基準及びその他の要求事項 Performance criteria and other requirements for analytical methods (part 2)」に規定されている同定、又は同定プラス定量の要求事

項に従い設定されなくてはならない。

許容基準が設定されていない物質の場合、CC α は以下により設定することができる。

— ISO 11843 に従った検量線手順 (当文書では正味状態変数の限界値 (critical value of the net state variable) と呼ぶ) のいずれかによる。この場合、最小要求性能限界濃度以上で、等間隔で添加されたブランク試料を用いるものとする。試料を分析する。同定後、添加濃度に対してシグナルをプロットする。切片の室内再現性の標準偏差の 2.33 倍を y 切片に加えた値に対応する濃度が判定限界に等しい。これは定量分析のみに適用される ($\alpha = 1\%$)。

— 又は、分析成分が予想される時間枠内でシグナル対ノイズ比を算出できるように、マトリックス当たり少なくとも 20 のブランク試料を分析する。シグナル対ノイズ比の 3 倍を判定限界として用いることができる。これは定量分析及び定性分析に適用される。

許容基準が設定されている物質の場合、CC α は以下のいずれかにより設定することができる。

— ISO 11843 に従った検量線作成手順 (当文書では正味状態変数の限界値 (critical value of the net state variable) と呼ぶ) のいずれかにより。この場合、許容基準付近で等間隔で添加されたブランク試料を用いるものとする。試料を分析する。同定後、添加濃度に対してシグナルをプロットする。室内再現性の標準偏差の 1.64 倍を許容基準に加えた値に対応する濃度が判定限界に等しい ($\alpha = 5\%$)。

— 又は、許容基準で分析成分を添加したマトリックス当たり少なくとも 20 のブランク試料を分析する。対応する標準偏差の 1.64 倍を許容基準に加えた濃度が判定限界となる ($\alpha = 5\%$)。

3.1.2.6. 検出能力 Detection capability (CC β)

検出能力は、規定されているスクリーニング、同定、又は同定プラス定量の要求事項に従い設定さ

れなくてはならない。

許容基準が設定されていない物質の場合、 $CC\beta$ は以下により設定することができる。

— ISO 11843 に従った検量線作成手順(当文書では正味状態変数値の最小検出可能値(minimum detectable value of the net state variable)と呼ぶ)。この場合、最小要求性能限界濃度以下で等間隔で添加された代表的なブランク試料を用いるものとする。試料を分析する。同定後、添加濃度に対してシグナルをプロットする。判定限界で測定された平均含有量の室内再現性の標準偏差の 1.64 倍を判定限界に加えた値に対応する濃度が検出能力に等しい($\beta = 5\%$)。

— 判定限界で分析成分を添加したマトリックス当たり少なくとも 20 のブランク試料を分析する。試料を分析し、分析成分を同定する。測定された含有量の室内再現性の標準偏差の 1.64 倍を判定限界に加えた値が検出能力に等しい($\beta = 5\%$)。

— 定量結果がまったく得られない場合、検出能力は、判定限界以上の濃度で添加したブランク試料の調査により設定可能である。この場合、偽適合結果が 5%以下に留まるのであれば、その濃度が分析法の検出能力に等しい。従って、この設置に関して信頼性の高い根拠を確保するためには少なくとも 1 濃度について少なくとも 20 回の調査を行わなくてはならない。

許容基準が設定されている物質の場合、 $CC\beta$ は以下により設定することができる。

— ISO 11843 に従った検量線作成手順[当文書では正味状態変数値の最小検出可能地(minimum detectable value of the net state variable)と呼ぶ]のいずれかによる。この場合、許容基準付近で等間隔で添加された代表的なブランク試料を用いるものとする。試料を分析し、分析成分を同定する。判定限界での平均測定含有量の標準偏差を計算す

る。室内再現性の標準偏差の 1.64 倍を判定限界に加えた値に対応する濃度が検出能力に等しい($\beta = 5\%$)。

— 又は、判定限界で分析成分を添加したマトリックス当たり少なくとも 20 のブランク試料を分析する。対応する標準偏差の 1.64 倍を判定限界に加えた値が検出能力に等しい($\beta = 5\%$)。』

(3) FDA(米国)

Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition⁴⁾

分析法の性能特性として検討すべきパラメータについては、分析の使用目的・種類・以前に妥当性評価された程度に応じて 3 つに分類されている。以下に該当部分を抜粋した。

『2.3 性能特性 Performance Characteristics

分析法を妥当性評価するために評価すべき性能特徴は、分析法の使用目的、分析法の種類(例:定量的か、定性的か)、及びそれが以前に妥当性評価された程度(例:マトリックス拡張、分析成分拡張、プラットフォーム拡張)に応じて変化する。これらの特性の定義は付録 1(用語集)に含まれているが、この文書は、分析法の検出レベル、検出限界又は定量限界などの特性を計算する様々な方法を扱うことを意図するものではない。

新規定量分析法の妥当性評価のための性能特性: 新規定量分析法の妥当性評価は、次の性能特性について最低限評価すべきである: 精確さ、精度、選択性、検出限界、定量限界、直線性(又は他の校正モデル)、適用範囲、測定不確かさ、堅牢性、同定の確認、及び添加回収率。

新規定性分析法の妥当性評価のための性能特性: 新規定性分析法の妥当性評価は、最低限次の性能特性について評価すべきである: 感度、選択性、偽陽性率、偽陰性率、最小検出濃度、堅牢

性、及び同定の確認。

分析法拡張の妥当性評価のための性能特性：

以前に妥当性評価された分析法の拡張について妥当性評価するには、その拡張の目的を慎重に評価する必要がある。試料調製及び/又は抽出手順/分析法が既存の試験手順から修正される場合、その変更が得られるデータの精度及び精確さに悪影響を及ぼさないことを実証すべきである。修正された方法を実施するために、一般的にはまず初めに標準又は既存の分析法が実施される。その後、既存の分析法と比較することにより、修正された方法の性能が検証される。』

本ガイドラインでは、また、食品中の化学分析成分に関する規制分析法の妥当性評価の要件について、分析法の目的に応じて以下の4つのレベルを定義している。各レベルの主要な妥当性評価パラメータの要件は表1(「図表」参照)にまとめられている。

レベル1:緊急/限定的使用

レベル2:単一試験室妥当性評価

レベル3:多施設妥当性評価

レベル4:完全共同試験

厚生労働省における試験法開発をこの分類に当てはめると(完全に一致するわけではないが)、個別試験法開発についてはレベル2に、一斉試験法の妥当性評価試験はレベル3に相当すると思われる。評価基準の目標値については、定量分析法の場合は表A2.1(「図表」参照)に、定性分析法(限度試験/スクリーニング分析法)の評価基準(偽陽性率及び偽陰性率)は表A.2.2(「図表」参照)に示した。

(4) オーストラリア

1) Veterinary Manual of Requirements and Guidelines - Vet MORAG: Part 5A - Residues⁵⁾

「5. 残留データ要求事項」の「5.4. 分析法」において、標的組織中の指標残留濃度で使用された分析法について、適切な妥当性評価データの提出が求められており、そのデータには次の内容が含まれなくてはならないとしている。

特異性 Specificity: 選択性と同義

真度 Accuracy: 真の値と実験手順を非常に多数回適用することにより得られる結果の平均値との一致の近さと定義しているが、添加回収実験によっても測定可能であるとしている。

精度 Precision: 精度には併行精度(繰り返し性)と室内精度(室内再現性)があり、%相対標準偏差で表されるとしている。

検出限界 Limit of Detection (LOD): LODを許容される統計的確かさをもって分析成分の存在を推測することができる分析成分の最小測定量と定義している。LODを推定する1つの方法として、異なるソースから採取され調製されたブランク試料を分析($n \geq 20$)し、分析成分濃度の算術平均を求め、これにその標準偏差の3倍を加える方法を示している。

定量限界 Limit of Quantification (LOQ): LOQをその濃度以上であれば規定された真度及び精度で測定することができる分析成分の最小測定量であると定義している。

保存及び分析中の分析成分の安定性 Stability of the analyte during storage and analysis: 試料を6ヵ月以上保存する場合には、指標残留が安定であることを示すデータを提示することを求めている。同様に、分析操作中の指標残留の安定性を実証する事が求められている。

2) Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods⁶⁾

「分析法の妥当性評価」の項において、分析法

妥当性評価において考慮すべき項目が示されている。各項目について一部要約して以下に示した。

① 標準検量線 Standard calibration: 既知の純度の参照化合物を用いて、LOQ から試料抽出液中に見込まれる最大濃度又は MRL (案)のいずれか高い方までの範囲で、少なくとも3点の標準濃度を用いて評価する。

② 分析法の真度 Accuracy of the method: 分析法の真度とは、真値と回収率で補正された結果の平均値との一致の近さである。後者は、既知量の化合物を添加した試料を分析することにより得られる。真度の決定には LOQ かそれよりやや高濃度を用いる。(注: Accuracy は一般に精確さと訳されるが、精確さは真度と精度を合わせた概念であり、ここでは trueness (真度)のことを指していると思われる。)

③ 検出限界 Limit of detection: 検出及び確認は可能であるが、必ずしも定量化できるわけではない試料中の分析成分の最低濃度である。機器分析法では、通常、S/N = 3:1 が受け入れられるが、この値は目安である。

④ 分析定量限界 Limit of analytical quantitation: 許容可能な確かさをもって、試料中で定量可能な残留物の最低濃度である。MRL の設定を目的とした場合、LOQ は 定量的な回収が達成される最低濃度である。従って、どのような分析法であっても、提案された LOQ での回収率データを提出しなくてはならない。提出がなければ、LOQ は、食品について提出された許容可能な回収率データでの最低濃度と等しいとみなされる。

⑤ 分析法の特異性 Specificity of the method: 測定対象の分析成分と試験マトリックス中に存在すると考えられる他の物質とを識別する分析法の能力である。特異性の測定には、対象物質及

び類似物質の代謝に関する知識、並びに適切な参照標準が必要となる。(注: この場合、IUPAC では選択性 Selectivity の用語が推奨されている。)

特異性は、以下に示すどれか 1 つの方法で示すことができる。

i) クリーンアップ後の対照抽出物を用いて、LOQ の 30%を超える共抽出物質による干渉がないことを示す。

ii) 構造的に類似した物質に対する特異性は、クロマトグラフィー分離又は他の適切な測定方法により、in vitro で示するのが最適である。

iii) i) 及び ii) が上手くいかない場合は、実残留組織の検討が適切と思われる。

⑥ 分析法の精度(回収率の範囲) Precision of the method (recovery range): 精度の2つの尺度は、繰り返し性(併行精度)及び再現性(室間精度)である。繰り返し性とは、同一試験室で、同一実施者が行った分析法で得られた、試験結果間の変動をいう。再現性は、異なる実施者、及び好ましくは異なる試験室による変動の尺度である。回収率の変動係数は、精度の尺度とみなすことができる。

動物用医薬品について検討する際の分析法の妥当性評価の許容基準を下表にまとめた。

分析成分の濃度, mg/kg	繰り返し性 CV%	再現性 CV%	真度(平均回収率%の範囲)
≤0.001	36	54	50~120
>0.001 - 0.01	32	46	60~120
>0.01 - 0.1	22	34	70~120
>0.1 - 1	18	25	70~110
>1	14	19	70~110

3) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Analytical

Methodology⁷⁾

「2. 残留分析法の妥当性評価に関するガイダンス」の「2.1. 性能特性」の項において、分析法妥当性評価で評価する性能特性を以下に示した。このうち重要なものを抜粋してまとめた。

性能特性 Performance characteristics

- ① 標準較正 standard calibration
- ② 線形性 linearity
- ③ 真度 accuracy (訳者注: accuracy は一般に「精確さ」をさすが、この文書では真度(trueness)として取扱う。)
- ④ 精度 precision
- ⑤ 検出限界 limit of detection
- ⑥ 定量限界 limit of quantitation
- ⑦ 選択性又は特異性 selectivity or specificity
- ⑧ マトリックス中での安定性 stability in matrix
- ⑨ 保存安定試験の実施 conduct of storage stability trials
- ⑩ 工程試料の安定性 process sample stability
- ⑪ 頑健性 robustness

2.1.1. 標準較正 Standard calibration

直線性は、定量限界から試料抽出液の中に見込まれる最大濃度又は最大残留基準値(案)のいずれか高い方までの範囲で、少なくとも5点の標準濃度を用いて評価すべきである。

2.1.2. 線形性 Linearity

1) 標準検量線は、方法に応じて3つの形式で作成することができる。

- ① 溶媒又は緩衝液中の標準
- ② 対照マトリックス抽出液に添加された標準
- ③ 対照マトリックスに添加され抽出手順により処理された標準

2) 直線性は、最低5点の異なる濃度を用いて、既知の濃度に対する応答についての、直線、多項式

又は他の(適切な場合)回帰プロットによって記述する。

3) 重み係数の受け入れ可能性は、3回の測定ランにおいて残差がランダム分布しているかどうかを評価することにより判断されるべきである。残差の評価は、少なくとも3回の独立した測定ランで行う。

4) 検量線の推奨される許容基準

上記1)の①及び②: より厳格な許容基準(すべての濃度で繰り返し性(併行精度)15%以下、但し、定量限界以下では20%以下が許容可能)が要求される。

上記1)の③: 試料と同じ精度の受け入れ基準に従う。

2.1.3. 真度 Accuracy

真度とは、分析成分の濃度の真値と実験手順を非常に多数回適用して得られる結果の平均値との一致の近さをいう。また、真度は、添加したブランクマトリックス(相互に独立した複製試料)を用いた回収率実験によっても決定することができる。残留分析法の推奨される真度は、分析成分の濃度に依存する。真度は、表1に示す範囲を満たすことが望ましい。

表1: 分析成分の濃度と許容される真度の範囲

分析成分の濃度(µg/kg)*	真度の許容範囲
< 1 µg/kg	-50% ~ +20% (50~120%)
≥ 1 µg/kg	-40% ~ +20% (60~120%)
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	-30% ~ +10% (70~110%)
≥ 100 µg/kg	-20% ~ +10% (80~110%)

* µg/kg = ng/g = ppb (マイクログラム/キログラム = ナノグラム/グラム = 10億分の1)

2.1.4. 精度 Precision

一般に、分析成分の様々な濃度における反復分析(n=6)のパーセント相対標準偏差で表される。

異なる試験室間の分析の変動は再現性(再現精度、reproducibility)と定義され、試験室内での繰り返し分析の変動は繰り返し性(併行精度、repeatability)と定義される。単一試験室妥当性評価の精度には、ラン内(繰り返し性、併行精度)及びラン間の要素を含めるべきである。

分析法のラン内及びラン間の精度は、妥当性評価手順の一部として測定することができる。分析法を開発している試験室は、多くの場合、残留試験の試料を分析する試験室と同じであることが多いため、通常、残留減衰試験を実施するために再現性(室間精度)を測定する必要はない。分析法の再現性を確立する代わりに、ラン内精度を測定することができる。ラン内及びラン間の精度は、3日間の分析において、意図された妥当性評価範囲(定量限界を含むべきである)を代表する異なる3濃度で、最低3回の反復分析を評価することにより決定すべきである。

残留分析法の妥当性評価に関しては、許容可能な変動は分析成分の濃度に依存する。精度は、表2に示す範囲を満たすべきである。

表 2: 分析成分の濃度と許容可能なラン内及びラン間精度

分析成分の濃度	ラン内精度(併行精度)の許容される変動係数(CV)	ラン間精度の許容される(CV)
< 1 µg/kg	30%	45%
≥ 1 µg/kg 及び < 10 µg/kg	25%	32%
≥ 10 µg/kg 及び < 100 µg/kg	15%	23%
≥ 100 µg/kg	10%	16%

2.1.5. 検出限界 Limit of detection

検出限界(LOD)は、許容される確かさをもって試験試料中の分析成分の存在を推定することがで

きる分析成分の最小測定濃度である。LOD は、20 対照試料(少なくとも 6 つの別々の供給源)の分析結果の平均値+平均値の標準偏差の 3 倍として推定される。

2.1.6. 定量限界 Limit of quantitation

定量限界(LOQ)は、規定された真度及び精度で測定することができる分析成分の最小測定濃度である。LOQ は、20 対照試料(少なくとも 6 つの別々の供給源)の分析結果の平均値+平均値の標準偏差の 10 倍として推定される。

推定された LOQ で真度及び精度の試験を行うことは、LOQ の決定に関する確定的な証拠を提供する。当該濃度での真度及び繰り返し性(併行精度)が、表 2 の許容範囲以下であれば、推定された LOQ は許容される。

2.1.11. 頑健性 Robustness

頑健性は、特に時間の経過とともに変更や修正を受けると考えられる分析法の条件について評価すべきである。これらの条件には、試薬ロット、インキュベーション温度、抽出溶媒の組成及び容量、抽出時間及び抽出回数、固相抽出カートリッジのブランド及びロット、分析カラムのブランド及びロット、及び高速液体クロマトグラフィーの溶出溶媒の組成などが含まれる。測定法の開発、妥当性評価又は使用中に、これらの条件の一部又はすべてに対する分析法の感度を明らかにすることができる、そのため分析法の性能に最も影響を与える可能性がある条件の変動について評価することが望ましい。

(5) コーデックス委員会

Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals

(CAC/GL 71-2009)¹¹⁾

本ガイドラインでは、分析法の性能特性について、スクリーニング分析法、定量分析法及び確認分析法に分けて規定している。

スクリーニング分析法の性能特性として、偽陽性率 (rate for “false positive”)、偽陰性率 (rate for “false negative”)、感度、選択性及びカットオフ値 (又は閾値) を規定している。しかし、感度や選択性の評価に 30 以上のデータを必要としており、また、「一般にスクリーニング分析法のカテゴリーに適合するこれらの分析法は、化合物を明確に同定しないような微生物の生育阻害、免疫測定、又は発色反応に基づくものが多い」としていることから、検査キットなどを想定している可能性がある。そのため、本ガイドラインの機器分析への適用についてはさらに検討が必要と思われる。以下に該当部分を示した。

『スクリーニング分析法の性能特性

160. スクリーニング分析法は、通常、その性質上定性的又は準定量的であり、閾値を超える検出可能な残留物が含まれていない(「陰性」)試料と閾値を超える残留物を含む(「陽性」)試料を区別することを目的としている。従って、妥当性評価の方針は、結果が「陽性」となる閾値濃度の設定、統計学に基づいた結果の「偽陽性」率及び「偽陰性」率の決定、干渉に関する試験及び適切な使用条件の設定に重点が置かれる。

161. 特に検査キットを用いるスクリーニング検査において、「感度 (sensitivity)」という用語は、分析対象物が規定の統計的限界内で確実に検出される最低濃度をいう。検査キットに関する AOAC 性能検査プログラム (AOAC Performance Tested Program)では、感度は、標的濃度で分析成分を添加した最低 30 の残留のない試料を試験することにより実験的に決定される。試料は最低 6 つの異

なる供給源(即ち、少なくとも 6 つの供給源の各々から少なくとも 5 つの反復試料)から採取されるべきであり、これらの試料は標的濃度で添加したときにすべて陽性結果となるべきである。3 つ以上の陰性結果を生じた場合は、感度検査に不合格となる。1 つ又は 2 つの陰性結果を生じた場合は、実験を繰り返す必要があり、その結果陰性結果が 2 つであれば不合格となる。実験は、既知の実残留試料が入手可能であればこれを用いて標的濃度で繰り返し行うべきである。

162. スクリーニング分析法の「選択性 (selectivity)」とは、陰性応答を与える試料が真に陰性であることを判定する試験能力をいう。また、

試験は、標的化合物又は化合物群の存在を、試料に存在すると考えられる他の物質と区別できなくてはならない。スクリーニング分析法は、化合物グループ又は種類に共通の構造的特徴を利用することが多いため、通常、その選択性は定量分析法ほど良好ではない。一般にスクリーニング分析法のカテゴリーに適合するこれらの分析法は、化合物を明確に同定しないような微生物の生育阻害、免疫測定、又は発色反応に基づくものが多い。スクリーニング分析法の選択性は、クロマトグラフィー又は他の分離手法の後に検出系を用いることにより増大させることができる。95%信頼水準(スクリーニング試験に推奨される)で少なくとも 90%の選択率を実証するために、最低 6 つの異なる供給源からの代表的ブランク試料マトリックスについて、30 回の反復分析を実施する。すべての結果は、陰性となるべきである。その後、予想される干渉及び交差反応について、予想される干渉物質(動物に投与される可能性のある他の薬剤、予想される環境汚染物質、薬剤の代謝物、又は化学的関連のある化合物など)を添加したブランクマトリックス物質を試験することにより追加試験を行うことができる。こ

れら化合物が、試料中に合理的に予想される濃度で存在するとき、応答はやはり陰性となるべきである。

163. 特定の化合物に対する試験の「カットオフ値」又は閾値は、濃度を漸増して、各濃度で添加した、通常、30 個の複製試料(少なくとも 6 つの供給源からの)を用いた濃度-応答実験により設定する。30 個の複製試料のすべてが陰性応答を示す濃度及び 30 個の複製試料のすべてが陽性応答を示す濃度が確定したならば、「すべて陰性」の濃度と「すべて陽性」の濃度の間の均等な間隔の 4 濃度で添加したブランクマトリックス物質を用いて実験を繰り返す。追加のセットは、「すべて陽性」の濃度より 20%高い濃度で試験を行う。結果の統計解析により、使用者は必要な信頼水準(通常 95%)⁸で信頼できる検出濃度(detection concentration)を設定することが可能となる。

⁸Finney, D.J. (1978) Statistical Method in Biological Assay, 3rd edition. MacMillan Publishing Co., New York.』

定量分析法の性能特性としては、選択性(Selectivity)、精確さ(accuracy)[真度(trueness)又はバイアス(bias)]、回収率(Recovery)、精度(precision)[併行精度(repeatability)及び再現精度(reproducibility)]、検量線(calibration curve)、直線性(linearity)、検出限界(detection limit)及び定量限界[limit of quantification (LOQ)]を規定している。ただし、このうち精度については、「単一試験室における分析法妥当性評価では、精度は、最低 6 つの異なる蓄積組織、異なる試薬バッチ、望ましくは異なる装置などを用い、望ましくは異なる分析者により異なる日に実施した実験から決定すべきである。」としているため、室内精度(室内再現性)(Within-laboratory Reproducibility)のことを指

しているものと思われる。即ち、再現精度(室間精度)の代わりに室内精度を求めることを意図しているものと思われるが、評価基準の目標値については明確には示されていない。

このうち、MRLVD の規制施行のための分析法では、表 1(「図表」参照)に示す真度及び精度の性能基準を満たすことが推奨されている。以下に、関連部分を抜粋した。

『定量分析法の性能特性』

164. 選択性 Selectivity(化合物からのシグナル応答を、試料中に存在し得る他の化合物の存在下で検出し区別する分析法の能力)は、食品中の残留動物用医薬品に関する規制管理プログラムで用いられる分析法の性能特性を定義する際に特に重要である。これには考慮しなくてはならない 2 つの側面がある — 即ち、試料中又は試料抽出物中に存在し得る他の化合物の干渉を受けずにシグナル応答を示す分析法の能力、及び特定の化合物だけに関連するものとしてシグナル応答を確実に同定する分析法の能力である。定量分析法に対しては、定量に用いたシグナルは、対象とする分析成分のみに関連し、共抽出物質に関する寄与が含まれていないことが要求される。完全に分離していないピークに基づくクロマトグラフィー分析は、信頼性の低い定量結果を示す。特定の化合物又は構造により特異的な元素特異的検出器や検出波長又は質量選択検出器の使用は、クロマトグラフィー分離と組み合わせることにより、食品中の残留動物用医薬品に関する定量分析法の選択性は向上する。

165. 分析法の選択性に加え、信頼性のある定量結果を与える分析法の能力を実証しなくてはならない。これは 2 つの要素からなる。

(a) 試料中に存在する分析成分の濃度に関して、真値又は許容される値に対する結果の近さ。

(精確さ accuracy、真度 trueness、又はバイアス biasとして表される。)及び

(b) 反復測定において一貫した結果を与える分析法の能力。[精度 precision (併行精度 repeatability 及び再現精度 reproducibility)として表される。]

166. コーデックス MRLVD をサポートするために用いられる分析法は、表 1 に示す真度及び精度に関する性能基準を満たすことが推奨される。表中、 CV_A は、抽出前に添加されたブランクマトリックスの試験試料によって決定される変動係数を表し、 CV_L は試料処理のばらつきに関する 10% の推定値を加味した試験室全体の変動係数を表す。

167. (前出のため略)

168. (前出のため略)

169. 精度 Precision は、同一試料からの測定試料についての反復測定間のばらつきを数値化したものであり、これもまた、試料中の残留物が MRLVD 又は他の規制措置限界を超えていると考えられる場合の判定において重要な検討事項である。分析法の精度は、通常、試験室内変動(併行精度) 及び分析法が多施設試験にかけられた時には試験室間変動(再現精度) で表される。単一試験室における分析法妥当性評価では、精度は、最低 6 つの異なる蓄積組織、異なる試薬バッチ、望ましくは異なる装置などを用い、望ましくは異なる分析者により異なる日に実施した実験から決定すべきである。分析法の精度は、通常、標準偏差として表される。別の有用な用語は、相対標準偏差又は変動係数(算術平均の絶対値で除した標準偏差) である。精度は 100 を乗じることによって百分率として報告されることがある。

170. (前出のため略)

171. 定量分析法は、通常、試料中の分析成分からの応答と、既知濃度の溶液中の分析成分の標準

品からの応答との比較に基づいている。分析法の開発と妥当性評価では、最初に検量線を決定し、一連の濃度範囲わたる標準品に対する検出器応答を評価すべきである。これらの濃度(最低 5 濃度及びブランク)は、対象分析成分の全濃度範囲を網羅し、結果として生じる曲線(検量線)は、統計学的に表現されるべきである。しかしながら、校正サンプルに適切なブランク試料を含めることが推奨されるが、これは、定量結果を得るために、検量線の低濃度範囲への外挿が許容されることを意味するものではない。分析関数は、対象分析成分の範囲全体にわたって、様々な濃度で試料から回収される分析成分の応答を関係づける。特定の試料(マトリックス)中に MRLVD 又は規制値が設定されている分析成分については、応答は、一般に、既知のブランク試料及び MRLVD の上下の濃度範囲で添加されたブランク試料(6 つの異なる供給源のブランク物質の使用が推奨される)について測定される。

172. 分析関数の実験データは、また、各濃度での分析回収率の計算にも使用することができ、マトリックス共抽出物の存在によって分析成分の応答が分析成分の標準品と比較して変化する場合に特に重要である。直線性 linearity は、分析関数の実験から決定され、目標濃度を添加した試料の分析のために得られた検量線の統計的表現法である。直線性は、一般に、線形応答があると仮定し、データの線形回帰分析から決定される。既知の代表的なブランクマトリックス物質に目標値をはさむ適切な濃度範囲で標準品を添加して作成した検量線(分析関数)に基づいて定量を行うことが、食品中の残留動物用医薬品の分析法によくみられるようになっている。校正のためのこのような「組織検量線 tissue standard curve」の使用は、得られた分析結果に回収率補正が組み込まれている。

173. 特定の分析法を用いて分析成分の存在に関する確実な検出、定量、又は確認を行うことができる下限値を確立することも必要である。検出限界 detection limit は、実際的には、試料中の分析成分を同定可能な最低濃度として説明される。検出限界は、上述の分析関数実験で作成された検量線の線形回帰分析で得られた標準偏差 ($S_{y/x}$) を用いて推定することができる。この手法を用いると、検出限界は、検量線の y 切片 (正の値と仮定) + 3 $S_{y/x}$ を使用して計算される。この手法は、検出限界の控えめな推定を与える。検出限界はまた、代表的な検体の測定により、ブランク中の分析成分の最小応答値にその標準偏差の 3 倍を加える ことによっても推定が可能である。この手法を用いる場合は、ほとんど検出できないような応答が生じる濃度で検体に添加し、ブランクの標準偏差の近似値を得る必要があることが多い。

174. 定量限界 limit of quantification (LOQ) は、limit of quantification 又は quantification limit とも呼ばれ、同じ実験で検量線の y 切片 + 10 $S_{y/x}$ により設定することができる。コーデックス委員会により設定された MRLVD をサポートするために使用される分析法の定量限界については、表 1 の精度及び精確さ (回収率) の基準を満たし、MRLVD と同じかその 1/2 以下 が望ましい。しかしながら、分析法の定量限界が、MRLVD の遵守のためにモニターされた実際の濃度よりも低い場合、分析法の妥当性評価及びその後の適用は、最低校正濃度 lowest calibrated level (LCL) に基づくべきであり、この濃度は一般には MRLVD の 0.5 倍 である。規制プログラムでの使用では、MRLVD 以下の濃度で残留物をモニタリングすることに関心がある残留物への暴露を推定するのに分析法が適用される場合、又は ADI や MRLVD が持たない物質について残留分析を行う場合は、検出限界及び定量

限界が重要なパラメータとなる。MRLVD の遵守の監視のためには、MRL 濃度が確実に定量されることを実証する分析法に LCL を含めることが重要である。MRLVD をサポートするために使用される分析法の LCL は、LOQ より小さくするべきではない。コーデックスの手続きマニュアルでは、「クライテリアアプローチで用いられる用語 (Terms to be Used in the Criteria Approach)」の項で定量限界に determination limit という用語を推奨している。』

確認分析法の性能特性 については、選択性が確認分析法のための第一の考慮事項であるとしている。また、フーリエ変換赤外分光法又は質量分析などの特定の機器技術は、明確な同定を提供するのに十分な選択性があり、確認分析法ではこれらの 機器による技術 に基づくことが多いとしている。質量分析のうち、低分解能 GC/MS 及び LC/MS に基づく確認分析法の性能要件が表 2 に示されている。

表 2 種々の質量分析法技術を用いた相対イオン強度 (標準品に対する試料の値) の性能要件

相対イオン強度 (ベースピークに対する%)	GC-MS (EI) (相対)	GC-MS (CI), GC-MS/MS, LC- MS, LC-MS/MS (相対)
> 50%	≤ 10%	≤ 20%
20%~50%	≤ 15%	≤ 25%
10%~20%	≤ 20%	≤ 30%

質量分析については、低分解能質量分析法 (シングル及び MS/MS) 及び高分解能質量分析法 (シングル及び MS/MS) について、同定ポイントの概念を導入して確認のための指標を示している。しかし、この同定ポイントに基づく確認方法は、科学的ではないとする意見もある¹²⁾。

質量分析法意外にも手法を組み合わせることで確認手法と同等の選択性を達成できる場合がある。例えば、同定は以下のような方法の組み合わせにより検証が可能であるとしている。

- (a) 薄層クロマトグラフィー
- (b) 元素特異的ガスクロマトグラフィー及び付属する検出システム
- (c) 特徴的な誘導体形成に続いて追加クロマトグラフィー、又は
- (d) 極性の異なる複数のクロマトグラフィーシステムを用いた化合物に特異的な相対保持時間の測定

そのほかの性能特性としては、「規制管理プログラムで用いられる分析法の一般性能特性」の項で、堅牢性(Ruggedness)と分析中の分析成分の安定性(Analyte stability)に言及している。堅牢性試験では、管理ポイントを決定するために、試薬容量又は濃度、pH、インキュベーション又は反応時間及び温度、試薬の品質、及び試薬又はクロマトグラフィー材料の異なるバッチ又は供給源などの変動を検討すべき要因としている。安定性については、規制のためのすべての分析法について、処理から分析完了まで、及び試料が分析を待つ間の一般的な保管条件において、試料物質の存在下で標準物質及び分析成分の両方について確立しなければならないとしている。

D. 結論

28年度の農薬の残留分析法に関する調査から、分析法の「抽出効率」が、真の残留濃度を測定するための最も重要な要素であった。29年度は動物用医薬品及び畜産物の残留分析法に関する分析法開発の方針等について調査したところ、同様に多くのガイドライン等で分析法の抽出効率あるいは

抽出操作について詳細な検討及び報告が求められていた^{2, 4, 7, 11)}。オーストラリアのガイドラインでは、分析法の抽出効率は、実残留試料を用いて決定する必要があり、放射性標識試験のための試料の分析(ラジオバリデーション)又は実残留試料を異なる溶媒の組み合わせで徹底抽出することによって実証された抽出手順を採用すべきであることが示されている^{6, 7)}。

28年度の調査により、抽出効率は、分析前に分析対象化合物を添加した試料を用いた従来の添加回収試験並びに標準添加法及び安定同位体標識した内標準法を用いても検証できないことが示されている。理想的には前出の実残留試料を用いたラジオバリデーションを行うべきであるが、検査機関での実施は現実的ではない。ラジオバリデーションの代わりに、EUのガイドライン³⁾では、認証標準物質を用いて真度*を求めて評価することを推奨しており、認証標準物質が入手できない場合に、添加試料から得られた回収率*により評価することが許容されるとしている。(* 認証標準物質で求めた場合を真度、添加回収試験で求めた場合を回収率として区別しているが、どちらも同じ目標値を用いている。)

米国のガイドライン⁴⁾においても、真度は認証標準物質によってのみ設定することができ、認証標準物質が入手可能な場合はこれを必ず用いることと規定している。認証標準物質が入手できない場合に、真度の代わりに添加回収試験で回収率を算出することができるとし、回収率はあくまで次善の方法として位置づけられている。また、入手可能な場合は、実残留試料を用いて、精度及びバイアスを評価するために用いることができるとしている。さらに、参照分析法(既存公示試験法や妥当性評価された試験法など)と開発した分析法の性能を比較することにより評価することも一つの方法であ

る。

以上のように、試験法開発に関しては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同様な考え方を適用できると思われる。以下に分析法開発に関する基本的な考え方をまとめた。

1. 抽出効率の評価は、放射性標識された分析対象化合物を用いたラジオバリデーションによって行うべきであり、ラジオバリデーションにより確立された申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。適切な検証が行えない場合には、申請時の抽出法を用いる。
2. 適切な抽出効率を確保するためには、バリデーションされた抽出法は変更せずに実施する。
3. 分析法を変更する場合は、抽出液を得た以降の精製操作に対してのみ行うのが原則である。
4. 抽出法を変更する場合[ラジオバリデーションによらない抽出効率の評価方法(真度の評価)]

- 1) 認証標準物質を用いた評価
- 2) 参照分析法との分析値の比較
- 3) 実残留試料を用いた抽出法の比較

① 2つの溶媒系の間を「ブリッジ(橋渡し)」する方法。(例えば、実残留試料を用いて、申請時の抽出条件で抽出した場合と、検討中の溶媒を用いて抽出した場合とで、分析結果を比較する。)

② 実残留試料の抽出残留物(残渣)を異なる溶媒の組み合わせで徹底抽出をする。

- 4) 添加回収試験

抽出残留物を異なる溶媒の組合せで抽出して分析値を比較することにより、より適切な抽出法が確立できると思われる。

実残留試料を用いた評価も、実際の検査機関では実施が困難であると思われることから、試験法を開発する場合や抽出法を変更する場合には、添加回収試験が最も採用可能な方法と考えら

れる。しかし、添加回収試験は実際の抽出効率を反映しない場合があることに留意し、抽出法の開発・変更に当たっては慎重に行うことが望まれる。

分析法の性能評価パラメータについては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同じであったが、目標値については国・機関により異なる場合があった。国・機関の主な性能評価パラメータ及び目標値をまとめ、それぞれ表 I 及び表 II に示した。性能評価パラメータ及び目標値については、分析法の評価の判断に差が生じないように、国際的な動向も踏まえ、適切に設定することが望ましいと思われる。

[追補]

28年度に、コーデックス委員会の残留農薬部会(CCPR)において検討されていた食品中の残留農薬分析法の性能評価基準のためのガイドライン原案(Draft Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food (At Step 6), Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, July 2016)についてまとめたが、本ガイドラインは29年に「Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food and Feed CAC/GL 90-2017¹⁴⁾」として公表された。対象マトリックスに飼料を追加し、一部文言の修正や要求事項の修正等が行われたが、基本的な内容については、原案からの大きな変更はなかった。参考に本ガイドラインの翻訳版(仮訳)を資料⑦として添付した。

E. 参考文献

- 1) Nemoto, S. Advancement of Official Analytical Methods for Residual Pesticides in Foods. Food

- Hyg. Saf. Sci. (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), **51**(6), 349-359 (2010).
- 2) 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて:12 動薬 A 第 418 号農林水産省動物医薬品検査所長通知(平成 12 年 3 月 31 日付け、一部改正 平成 30 年 2 月 28 日 29 動薬第 3867 号)
 - 3) COMMISSION DECISION 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C (2002) 3044), *Official Journal of the European Communities* L221/8-36, 17.8.2002
 - 4) Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition, US Food & Drug Administration, Office of Foods and Veterinary Medicine, April 2015
 - 5) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Veterinary Manual of Requirements and Guidelines - Vet MORAG, Part 5A – Residues.
 - 6) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Residue Guideline No. 26: Veterinary Drug Residue Analytical Methods
 - 7) Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Analytical Methodology (2014)
 - 8) International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, Guidance for Industry “Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies” VICH GL49(R), U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, March 2015.
 - 9) New Zealand, Ministry of Agriculture and Forestry, Residue Data for Agricultural Chemical Registration, ACVM Information Requirements 41, Prepared for Approvals and ACVM Group, October 2011
 - 10) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals, Section 5: Other Test Guidelines, Test No. 503: Metabolism in Livestock, 8th January 2007.
 - 11) Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programme Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (Adopted in 2009; Revised in 2012). CAC/GL 71-2009.
 - 12) Lehotey S. J., *et al.* • Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques *Trend in Analytical Chemistry* • 2008 • 27(1070-1090)
 - 13) 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン:食安発 1224 第 1 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知(平成 22 年 12 月 24 日付け)
 - 14) Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food and Feed CAC/GL 90-2017 (2017)
- F. 研究発表**
1. 論文発表
なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「図表」

(図表の番号は、各参考文献の番号を用いた。)

[FDA]

Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition⁴⁾

表 1. 化学分析法の主要な妥当性評価パラメータ要件

	レベル 1: 緊急/ 限定的使用	レベル 2: 単一試験室 妥当性評価	レベル 3: 多施設 妥当性評価	レベル 4: 完全共同試験
参加試験室数	1	1	≥ 2	8 (定量) 10 (定性)
マトリックスソースの数 (マトリックス 当たり)*	≥ 1	≥ 3 (可能な場合、 推奨)	≥ 3 (可能な場合、 推奨)	≥ 3 (可能な場合、 推奨)
分析成分の添加レベル数 (少なくとも 1 つのマトリックスソ ースに対して)**	≥ 2 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク	≥ 3 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク	≥ 3 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク	≥ 3 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク
必要な繰り返し数 (試験室ごとにテストされた各レ ベルでのマトリックスソース当た り)	≥ 2 (定量) ≥ 2 (定性)	≥ 2 (定量) ≥ 3 (定性)	≥ 2 (定量) ≥ 3 (定性)	≥ 2 (定量) ≥ 3 (定性)
必要な繰り返し数 (用いられるマトリックスソースが 1 つのみの場合、試験室ごとにテ ストされた各レベル当たり)	≥ 4 (定量) ≥ 6 (定性)	≥ 6 (定量) ≥ 9 (定性)	≥ 3 (定量) ≥ 6 (定性)	≥ 2 (定量) ≥ 6 (定性)

* 異なる物理化学特性を有する様々な食品マトリックスが選択される場合、各食品試料マトリックスのソース数は 1 つ以上である可能性があるが、もし 1 つの食品マトリックスしか試験されない場合には、入手可能であるならば 3 つ以上のソースが推奨される。添加レベルとマトリックスの組合せの総数が適切な場合 (例: 各添加レベルにおいて定量分析法では 6 つ以上、定性分析法では 9 つ以上の繰り返し試験) に限り、特にブランクのマトリックスソースを得ることが困難な場合は、マトリックスソース数を減らしてもよい。

** 添加レベル数は、マトリックスの少なくとも 1 つのソースに対して推奨される。マトリックスの他の同様のソース (例: 同じカテゴリー内、付録 4 参照) は、1 つ又は 2 つの添加レベル (例: 対策/指導又は許容レベル、又は定量/検出限界付近) で試験されてもよい。

表 A2.1. 分析濃度の桁の増加に対する評価基準

ML* ユニット	0.001 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	1 g/kg	10 g/kg
代替 ML* ユニット	1 ppb	10 ppb	100 ppb	1 ppm	10 ppm	100 ppm	0.1%	1 %
ML 濃度比 (C _{ML})	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²
最少適用範囲	0.0006~ 0.0014 mg/kg	0.006~ 0.014 mg/kg	0.03~ 0.17 mg/kg	0.52~ 1.48 mg/kg	6.6~ 13.3 mg/kg	76~ 124 mg/kg	0.83~ 1.2 g/kg	8.8~ 11 g/kg
LOD (≤ mg/kg)	0.0002	0.002	0.01	0.1	1	10	100	1000
LOQ (≤ mg/kg)	0.0004	0.004	0.02	0.2	2	20	200	2000
RSD _r **	22%	22%	11%	8%	6%	4%	3%	2%
PRSD _R #	22%	22%	22%	16%	11%	8%	6%	4%
RSD _R ###	≤ 44%	≤ 44%	≤ 44%	≤ 32%	≤ 22%	≤ 16%	≤ 12%	≤ 8%
回収率	40%- 120%	60%- 115%	80%- 110%	80%- 110%	80%- 110%	90%- 107%	95%- 105%	97%- 103%

* ML は分析濃度であり、分析法の使用目的に応じて、最大濃度、最小濃度、標準濃度又は濃度範囲として、分析成分/試料マトリックスの組合せで定義することができる。

** RSD_r 又は繰り返し性は、短い期間内で条件ができるだけ一定に保たれる場合の結果の一致の程度(例: 単一の試験室により示された反復試験の相対標準偏差又は最善の精度)を言う。一般的に、RSD_r の許容値は、表中の値の 1/2 から 2 倍である(HorRat_r = RSD_r(測定値、%)/RSD_r(計算値、%))。濃度比が ≥10⁻⁷ の場合は Horwitz 理論が適用される。濃度比が <10⁻⁷ 場合は Thompson 理論が適用される。

PRSD_R 又は予測相対再現性標準偏差(Predicted Relative Reproducibility Standard Deviation)は、Horwitz/Thompson 式に基づく。濃度比が <10⁻⁷ 場合は Thompson 理論が適用される。

RSD_R 又は再現性(再現精度)は、操作条件ができるだけ異なる場合の結果の一致の程度(例: 異なる試験室の同じ試験試料)を言い、Horwitz/Thompson 式から計算されるべきである。Horwitz/Thompson 式が適用できない場合(分析目的又は規制に従ったため)、もしくは分析法を基準に「変換する」場合は、適切な分析法性能試験から得られた RSD_R に基づくことが望ましい。測定値と予測値の比は、≤ 2 が望ましい(HorRat_R = RSD_R/PRSD_R ≤ 2)。

表 A2.2. 限度試験/スクリーニング分析法の一般的評価基準

偽陰性率	≤ 5%(懸念レベルにおいて ¹⁾)
偽陽性率	≤ 10-15%

¹ 許容可能な偽陰性率は、分析法の使用目的に大きく依存する。

[コーデックス委員会]

Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (CAC/GL 71-2009)¹¹⁾

表 1. 食品中の残留動物用医薬品の MRLVD をサポートするための定量分析法としての使用に適した分析法が満たすべき性能基準¹⁰

濃度 µg/kg	変動係数 Coefficient of Variability (CV)				真度 Trueness
	併行精度 (室内、CV _A) %	併行精度 (室内、CV _L) %	再現精度 (室間、CV _A) %	再現精度 (室間、CV _L) %	平均回収率% の範囲
≤ 1	35	36	53	54	50 - 120
1 ~ 10	30	32	45	46	60 - 120
10 ~ 100	20	22	32	34	70 - 120
100 ~ 1000	15	18	23	25	70 - 110
≥ 1000	10	14	16	19	70 - 110

CV_A: 抽出前に添加されたブランクマトリックスの試験試料によって決定される変動係数

CV_L: 試料処理のばらつきに関する 10%の推定値を加味した試験室全体の変動係数⁹

⁹ Fajgelj A., Ambrus A., eds. (2000) Principles of Method Validation, Royal Society of Chemistry, Cambridge UK.

¹⁰ CAC/GL 37-2001 分析法の回収率データの使用に関する IUPAC 調和ガイドライン (Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement)、Thompson, M., Ellison, S., Fajgelj, A., Willetts, P., & Wood, R. (1999) Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement, Pure Applied Chemistry, 71: 337-348 も参照のこと。

表 I 分析法の主な性能評価パラメータ

ガイドライン等 パラメータ	厚労省 (試験法 開発)	厚労省 (妥当性 評価)	農水省 (農薬)	農水省 (動薬)	EU (SANTE/11 945/2015)	EU (2002/657 /EC)	EPA (OPPTS 860.1340)	FDA (PAM I)	FDA (新規定量 分析法)	オーストラリア (農薬)	オーストラリア (動物薬①)	オーストラリア (動物薬②)	オーストラリア (動物薬③)	Codex (CAC/GL 40-1993)	CCPR (CAC/GL 90-2017)	CCRVDF (CAC/GL 71-2009)	OECD (ENV/JM/ MONO (2007)17)
選択性/特異性	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
真度/精確さ/回収率*	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
併行精度(繰り返し性)	○	○	○	○	○	○	○	—	○	○	○	○	○	○	○	○	○
室内精度(室内再現性)	—	○	—	○	○	○	—	—	—	—	○	—	○	—	○	△	△
(室間)再現精度(再現性)	—	—	—	—	—	○	—	—	○	—	—	○	—	○	—	○	○
検出限界 (LOD)	—	—	—	○	—	—	○	—	○	—	○	○	○	○	△	○	○
定量限界 (LOQ)	○	○	○	○	○	—	○	—	○	○	○	○	○	○	○	○	○
マトリックスの効果	○	—	—	—	○	—	—	—	—	—	—	—	—	—	○	—	—
直線性、検量線	—	—	—	○	○	○	—	—	○	○	—	○	○	○	○	○	○
溶液中の安定性	—	—	—	—	○	○	—	—	—	—	—	—	—	○	—	—	—
試料中での安定性	—	—	—	○	—	○	—	—	—	—	○	—	○	○	—	○	—
分析操作中の安定性	○	—	—	○	○	—	—	—	—	—	○	—	○	○	—	○	—
頑健性(堅牢性)	—	—	—	○	○	○	—	—	○	—	—	—	○	—	○	○	—
測定不確かさ	—	—	—	—	—	—	—	—	○	—	—	—	—	—	○	○	—
判定限界 (CC α)	—	—	—	—	—	○	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
検出能力 (CC β)	—	—	—	—	—	○	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
偽陽性率	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	○	—	—
偽陰性率	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	○	—	—
参考文献**	H29-1)	H29-13)	H28-2)	H29-2)	H28-4)	H29-3)	H28-5)	H28-6)	H29-4)	H28-9)	H29-5)	H29-6)	H29-7)	H28-14)	H29-14)	H29-11)	H28-19)

○:記載あり、△:記載はないが読み取れる、—:記載なし。

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

** H28 は 28 年度の報告書の参考文献の番号を示し、H29 は 29 年度の報告書の参考文献の番号を示す。

表Ⅱ 分析法の主な性能評価パラメータの目標値

ガイドライン等 パラメータ	厚労省 (試験法開発)		厚労省 (妥当性評価試験)		農水省 (農薬)	農水省 (動薬)				
	定量限界 ≤ 基準値 1/3	< 基準値濃度に相当するピークの 1/10	定量限界 ≤ 基準値 1/3	< 基準値濃度に相当するピークの 1/10	分析対象物質を含まない試料を用いて分析操作を行い、定量を妨害するピークがないこと。	ブランク試料の応答	LOQ の応答の 20% 以下			
選択性/特異性	定量限界 > 基準値 1/3	< 定量限界濃度に相当するピークの 1/3	定量限界 > 基準値 1/3	< 定量限界濃度に相当するピークの 1/3						
	不検出	< 定量限界濃度に相当するピークの 1/3	不検出	< 定量限界濃度に相当するピークの 1/3						
	真度/精確さ/回収率*	70% ~ 120%	70% ~ 120%	70% ~ 120%	-	< 0.001 mg/kg	50% ~ 120%			
	≤ 0.001 mg/kg	70% ~ 120%	≤ 0.001 mg/kg	70% ~ 120%	-	≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	60% ~ 120%			
	> 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg		> 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg			> 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg	≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	70% ~ 110%		
	> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg		> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg			> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	≧ 0.1 mg/kg	80% ~ 110%		
	> 0.1 mg/kg		> 0.1 mg/kg			> 0.1 mg/kg				
併行精度(繰り返し性)、RSD%	≤ 0.001 mg/kg	< 30%	≤ 0.001 mg/kg	< 30%	-	< 0.001 mg/kg	< 30%			
	> 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg	< 25%	> 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg	< 25%		≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	< 25%			
	> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	< 15%	> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	< 15%		≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	< 15%			
	> 0.1 mg/kg	< 10%	> 0.1 mg/kg	< 10%		≧ 0.1 mg/kg	< 10%			
室内精度(室内再現性)、RSD%	-	-	≤ 0.001 mg/kg	< 35%	-	< 0.001 mg/kg	< 45%			
	-	-	> 0.001 mg/kg ≤ 0.01 mg/kg	< 30%		≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	< 32%			
	-	-	> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	< 20%		≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	< 23%			
	-	-	> 0.1 mg/kg	< 15%		≧ 0.1 mg/kg	< 16%			
(室間)再現精度(再現性)、RSD%	-	-	-	-	-	-	-			
検出限界(LOD)	-	-	-	-	-	-	-			
定量限界(LOQ)	基準値が定量限界と一致している場合あるいは農薬等の残留基準告示において「不検出」とされる場合には、以下の条件①及び②を満足していることを確認する。 ① 添加試料の試験結果に基づく真度及び併行精度が上記の目標値を満足していること。 ② クロマトグラフィーによる測定では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピーク(①で得られるピークあるいはブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液から得られるピーク)は、S/N ≧ 10 であること。		基準値が定量限界と一致している場合あるいは農薬等の残留基準告示において「不検出」とされる場合には、以下の条件①及び②を満足していることを確認する。 ① 添加試料の試験結果に基づく真度、併行精度及び室内精度が上記の目標値を満足していること。 ② クロマトグラフィーによる測定では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピーク(①で得られるピークあるいはブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液から得られるピーク)は、S/N ≧ 10 であること。		試料について分析のすべての操作を行った場合に十分な回収率及び精度が得られる最低濃度で表すこととし、試験の目的に必要な感度を確保する。	-	-			
参考文献**	H29-1)		H29-13)		H28-2)	H29-2)				

○:記載あり、-:記載なし

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

** H28 は 28 年度の報告書の参考文献の番号を示し、H29 は 29 年度の報告書の参考文献の番号を示す。

表Ⅱ 分析法の主な性能評価パラメータの目標値(続き)

ガイドライン等 パラメータ	EU (SANTE/11945/2015)		EU (2002/657/EC)		EPA (OPPTS 860.1340)	FDA (PAM 1)	FDA (新規定量分析法)	
選択性/特異性	試薬ブランク及びブランク 対照試料の応答	RLの30%未満 (RL: Reporting Level)	1) 十分な数の代表ブランク試料(n≥20)を分析し、対象分析成分が溶出すると予測される関心領域での干渉を確認する。 2) 代表的なブランク試料には、分析成分の同定及び/又は定量に干渉する可能性のある物質を関連する濃度で添加する。 3) 分析後、以下について調査する。 ① 存在が誤った同定につながる可能性がある。 ② 対象分析成分の同定が1つ以上の干渉の存在によって妨害される。 ③ 定量に著しく影響する。		基準値の<20%	1) 試薬ブランクは、分析対象化合物と誤認するような検出器の信号を示さない。 2) 同じか、あるいは同様な食品で残留のないものにおいて、以前に行われた分析又は同時に行った分析は妨害となるような検出器の信号を示さない。	—	
真度/精確さ/回収率*	70 ~ 120%		< 0.001 mg/kg	50% ~ 120%	70 ~ 120%	80 ~ 110%	0.001 mg/kg	40% ~ 120%
≥ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg			70% ~ 110%	0.01 mg/kg			60% ~ 115%	
≥ 0.01 mg/kg			80% ~ 110%	0.1 mg/kg			80% ~ 110%	
				1 mg/kg			80% ~ 110%	
							10 mg/kg	80% ~ 110%
							100 mg/kg	90% ~ 107%
							1000 mg/kg (0.1%)	95% ~ 105%
							10000 mg/kg (1%)	97% ~ 103%
併行精度(繰り返し性)、 RSD%	≧ 20%		室間精度の1/2~2/3		試料間で大きく変動しないこと。	—	0.001 mg/kg	22%
							0.01 mg/kg	22%
							0.1 mg/kg	11%
							1 mg/kg	8%
							10 mg/kg	6%
							100 mg/kg	4%
							1000 mg/kg (0.1%)	3%
							10000 mg/kg (1%)	2%
室内精度(室内再現性)、 RSD%	≧ 20%		室間精度を超えないこと		—	—	—	
(室間)再現精度(再現性)、 RSD%	—		0.001 mg/kg	Horwitz 式を適用すると許容できない高値になるため、可能な限り低いものとする。	—	—	0.001 mg/kg	44%以下
			0.01 mg/kg				44%以下	
			0.1 mg/kg				44%以下	
			1 mg/kg	32%以下				
			10 mg/kg	22%以下				
		23%				100 mg/kg	16%以下	
		16%				1000 mg/kg (0.1%)	12%以下	
						10000 mg/kg (1%)	8%以下	

ガイドライン等 パラメータ	EU (SANTE/11945/2015)		EU (2002/657/EC)	EPA (OPPTS 860.1340)	FDA (PAM 1)	FDA (新規定量分析法)	
	検出限界 (LOD)	-		-	-	-	0.001 mg/kg
						0.01 mg/kg	0.002 mg/kg 以下
						0.1 mg/kg	0.01 mg/kg 以下
						1 mg/kg	0.1 mg/kg 以下
						10 mg/kg	1 mg/kg 以下
						100 mg/kg	10 mg/kg 以下
						1000 mg/kg (0.1%)	100 mg/kg 以下
						10000 mg/kg (1%)	1000 mg/kg 以下
定量限界 (LOQ)	真度及び精度に関する 分析性能基準を満たし ている最小添加濃度	基準値以下	-	-	-	0.001 mg/kg	0.0004 mg/kg 以下
						0.01 mg/kg	0.004 mg/kg 以下
						0.1 mg/kg	0.02 mg/kg 以下
						1 mg/kg	0.2 mg/kg 以下
						10 mg/kg	2 mg/kg 以下
						100 mg/kg	20 mg/kg 以下
						1000 mg/kg (0.1%)	200 mg/kg 以下
						10000 mg/kg (1%)	2000 mg/kg 以下
参考文献**	H28-4)		H29-3)	H28-5)	H28-6)	H29-4)	

○:記載あり、-:記載なし

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

** H28 は 28 年度の報告書の参考文献の番号を示し、H29 は 29 年度の報告書の参考文献の番号を示す。

表Ⅱ 分析法の主な性能評価パラメータの目標値(続き)

ガイドライン等 パラメータ	オーストラリア (農薬)		オーストラリア (動物薬②)		オーストラリア (動物薬③)	
選択性/特異性	-		ブランク試料の応答は、LOQの応答の30%以下		妨害物質の応答は、LOQの応答の30%以下	
真度/精確さ/回収率*	< 1 mg/kg	50% ~ 120%	≦ 0.001 mg/kg	50% ~ 120%	< 0.001 mg/kg	50% ~ 120%
			> 0.001 mg/kg ≦ 0.01 mg/kg	60% ~ 120%	≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	60% ~ 120%
	> 1 mg/kg	70% ~ 110%	> 0.01 mg/kg ≦ 0.1 mg/kg	70% ~ 120%	≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	70% ~ 110%
			> 0.1 mg/kg ≦ 1 mg/kg	70% ~ 110%	≧ 0.1 mg/kg	80% ~ 110%
		> 1 mg/kg	70% ~ 110%			
併行精度(繰り返し性)、 RSD%	< 1 mg/kg	35%	≦ 0.001 mg/kg	36%	< 0.001 mg/kg	30%
	> 1 mg/kg < 10 mg/kg	30%	> 0.001 mg/kg ≦ 0.01 mg/kg	32%	≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	25%
	> 10 mg/kg < 100 mg/kg	20%	> 0.01 mg/kg ≦ 0.1 mg/kg	22%	≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	15%
	> 100 mg/kg	15%	> 0.1 mg/kg ≦ 1 mg/kg	18%	≧ 0.1 mg/kg	10%
		> 1 mg/kg	14%			
室内精度(室内再現性)、 RSD%	-		-		< 0.001 mg/kg	45%
					≧ 0.001 mg/kg < 0.01 mg/kg	32%
					≧ 0.01 mg/kg < 0.1 mg/kg	23%
					≧ 0.1 mg/kg	16%
(室間)再現精度(再現性)、 RSD%	-		≦ 0.001 mg/kg	54%	-	
			> 0.001 mg/kg ≦ 0.01 mg/kg	46%		
			> 0.01 mg/kg ≦ 0.1 mg/kg	34%		
			> 0.1 mg/kg ≦ 1 mg/kg	25%		
			> 1 mg/kg	19%		
検出限界(LOD)	-		検出及び確認は可能であるが、必ずしも定量化できるわけではない試料中の分析成分の最低濃度である。機器分析法では、通常、S/N = 3:1 が受け入れられるが、この値は目安である。		LOD は、20 対照試料(少なくとも 6 つの別々の供給源)の分析結果の平均値+平均値の標準偏差の 3 倍として推定される。	
定量限界(LOQ)	-		LOQ は 定量的な回収が達成される最低濃度。 LOQ での回収率データがなければ、LOQ は許容可能な回収率データでの最低濃度。		LOQ は 20 対照試料(少なくとも 6 つの別々の供給源)の分析結果の平均値+平均値の標準偏差の 10 倍として推定される。 推定された LOQ で真度及び精度の試験を行うことは、LOQ の決定に関する確定的な証拠を提供する。当該濃度での真度及び繰り返し性(併行精度)が、上記の許容範囲以下であれば、推定された LOQ は許容される。	
参考文献**	H28-9)		H29-6)		H29-7)	

○:記載あり、-:記載なし

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

** H28 は 28 年度の報告書の参考文献の番号を示し、H29 は 29 年度の報告書の参考文献の番号を示す。

表Ⅱ 分析法の主な性能評価パラメータの目標値(続き)

ガイドライン等 パラメータ	Codex (CAC/GL 40-1993)		CCPR (CAC/GL 90-2017)		CCRVDF (CAC/GL 71-2009)		OECD (ENV/JM/MONO (2007)17)	
選択性/特異性	測定したレスポンスの由来が、その分析物成分のみからのものであること。		<ul style="list-style-type: none"> ・有意に悪影響を及ぼす妨害が起こらないこと。 ・試薬のバッチごとに試薬(工程)ブランクを分析することによって共通の妨害を確認する。 ・分析対象化合物どうしの干渉についても、混合標準溶液中で個々の分析対象化合物を確認する。 ・一般的な原則として、妨害が分析法の性能に全く影響を与えないような選択性が必要である。 ・試料又は試料抽出液中に存在すると考えられる他の分析対象化合物及びマトリックス化合物による干渉を受けないシグナル応答を示す必要がある。 		定量分析法に対しては、定量に用いたシグナルは、対象とする分析成分のみに関連し、共抽出物質に関する寄与が含まれていないことが要求される。		分析対象領域のブランク値は、LOQ の 30%を超えてはならない。	
真度/精確さ/回収率*	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	50% ~ 120% 60% ~ 120% 70% ~ 120% 70% ~ 110% 70% ~ 110%	LVL、LOQ 又は報告限界濃度、及びこれより高い少なくとも 1 濃度(例えば、LVL の 2~10 倍又は基準値)で最低 5 試行の繰り返し試験 [LVL:Lowest Validated Level (最低妥当性評価濃度)]	70% ~ 120%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	50% ~ 120% 60% ~ 120% 70% ~ 120% 70% ~ 110% 70% ~ 110%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	50% ~ 120% 60% ~ 120% 70% ~ 120% 70% ~ 110% 70% ~ 110%
併行精度(繰り返し性)、RSD%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	35% 30% 20% 15% 10%	LVL、LOQ 又は報告限界濃度、及びこれより高い少なくとも 1 濃度(例えば、LVL の 2~10 倍又は MRL)で最低 5 試行の繰り返し試験	$\leq 20\%$	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	35% 30% 20% 15% 10%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	35% 30% 20% 15% 10%
室内精度(室内再現性)、RSD%	-		$\leq 20\%$		-		-	
(空間)再現精度(再現性)、RSD%	$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	54% 46% 34% 25% 19%	-		$\leq 0.001 \text{ mg/kg}$ $> 0.001 \text{ mg/kg} \leq 0.01 \text{ mg/kg}$ $> 0.01 \text{ mg/kg} \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ $> 0.1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ $> 1 \text{ mg/kg}$	54% 46% 34% 25% 19%	-	
検出限界(LOD)	-		定量には有効ではないが、分析対象化合物の存在を推測するために、検出限界(LOD) (S/N = 3)を計算する場合もある。		<ul style="list-style-type: none"> ・試料中の分析成分を同定可能な最低濃度 ・検量線の y 切片(正の値と仮定) + 3 S_{y/x} (S_{y/x}: 検量線の線形回帰分析で得られた標準偏差) ・ブランク中の分析成分の最小応答値 + 標準偏差 × 3 倍 (ほとんど検出できないような応答が生じる濃度で検体に添加し、ブランクの標準偏差の近似値を得ることも可能。) 		検出は可能であるが必ずしも正確な値として定量化することができない試料中の分析対象化合物の最低量である。	

ガイドライン等 パラメータ	Codex (CAC/GL 40-1993)	CCPR (CAC/GL 90-2017)	CCRVDF (CAC/GL 71-2009)	OECD (ENV/JM/MONO (2007)17)	
定量限界 (LOQ)	<ul style="list-style-type: none"> ・5 点以上 ・添加濃度:0、LCL、AL 及び AL 濃度の 2~3 倍 ・3 反復以上 [LCL:Lowest calibration leve (最低検量線濃度)] [AL: Acceptable Limit (許容限界)]	平均回収率及び精度は、上記を参照のこと。 参照試料を分析した平均残留量は、合意値から有意 (P=0.05) に異なること。	<ul style="list-style-type: none"> ・分析化学的な定義に基づく LOQ (S/N=10) は、分析機器やその他多くの要因により日差変動があるため、実際に推定できるに過ぎない。妥当性評価ガイドラインによっては、LOQ での添加実験による検証が求められているが、この日差変動のために実際の分析法の LOQ よりも大幅に過大な推定をする傾向があり、厳密な LOQ の定義 (S/N = 10) を実行するのは困難である。 ・従って、LOQ の代わりに最低妥当性評価濃度 (Lowest Validated Level: LVL) で添加とすることが適切である。妥当性評価の目的は、LOQ を求めることではなく、報告された最低濃度が分析の要求を満たしていることを示すことである。 ・定量は、LVL より低濃度で行うべきではない。 ・最低校正濃度 (Lowest Calibrated Level: LCL) での S/N は ≥ 10 (濃度 \geq LOQ) でなくてはならない。 	<ul style="list-style-type: none"> ・検量線の y 切片 + 10 S_{y/x} (S_{y/x}: 検量線の線形回帰分析で得られた標準偏差) ・基準値と同じかその 1/2 以下が望ましい。 	<ul style="list-style-type: none"> ・分析対象化合物を明確に同定し、許容される平均回収率とこれに伴う相対標準偏差 (RSD) が得られる最低試験濃度。 ・LOQ の推定値: ノイズの標準偏差の 6~10 倍 (添加実験によって検証する。)
参考文献**	H28-14)	H29-14)	H29-11)	H28-19)	

○:記載あり、-:記載なし

* 真度、精確さ、及び回収率を、それぞれパラメータとして区別する場合と区別しない場合があったため、まとめて示した。

** H28 は 28 年度の報告書の参考文献の番号を示し、H29 は 29 年度の報告書の参考文献の番号を示す。

資料①: Guidelines for the Validation of Chemical
Methods for the FDA FVM Program 2nd Edition

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価のためのガイドライン

第 2 版

米国食品医薬品局
食品・動物用医薬品部

2015 年 4 月

本文書の原文は下記のタイトルで、英語で公表されたものである。

Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program 2nd Edition

<https://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM273418.pdf>

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に応じ原文を参照ください。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます。



メモ

日付: 2015年5月19日
送信元: FDA 食品・動物用医薬品科学研究運営委員会 (Foods and Veterinary Medicine Science and Research Steering Committee)
件名: FDA FVM プログラムのための化学分析法の妥当性評価に関するガイドライン(第2版)
送信先: FVM 行政委員会

食品・動物用医薬品部 (Office of Foods and Veterinary Medicine)、食品安全・応用栄養センター (Center for Food Safety and Applied Nutrition)、動物用医薬品センター (Center for Veterinary Medicine)、規制業務部 (Office of Regulatory Affairs)、国立毒性研究センター (National Center for Toxicological Research)、国際部 (Office of International Programs) 及び チーフ・サイエンティスト部 (Office of the Chief Scientist) の代表者で構成される、FDA 食品・動物用医薬品 (Foods and Veterinary Medicine : FVM) 科学研究運営委員会 (Science and Research Steering Committee : SRSC) は、FDA の FVM プログラムの作業班全体に関わる、食品・飼料関連の科学及び調査活動の優先順位を付け、調整し、統合する任務を負っている。

国内の食品供給の安全を確実にする任務を負う規制機関として、規制遵守、調査及び規制施行を支援するために必要とされる分析法は、意図した目的に適切で最も高い分析性能基準を満たすことが不可欠である。我々の試験室で使用される、化学物質及び放射性汚染物質、並びに微生物病原体を検出するために使用されるすべての規制分析法に対する標準化された妥当性評価要件の開発は、可能な限り最も高い基準を満たし続けることを確実にするための重要なステップである。

現在 SRSC により正式に採用されている付属文書は、我々の試験室において使用される化学分析法の評価において満たされなければならない要件を再確立するもので、2012年3月22日に承認された以前のガイドラインに取って代わるものである。近い将来、これらの更新されたガイドラインは、FDA のウェブサイトに掲示され、これらのガイドラインの公表及び普及のための追加の場所についても現在調査中であり、利用可能となった時点で公表される予定である。この化学分析法妥当性評価標準作業手順を、化学分析法妥当性評価プロジェクトを実施又は監督する可能性のある人、あるいは、これらの更新された要件を認識する必要がある人と共有していただくことを希望する。

化学分析法妥当性評価小委員会 (Chemical Methods Validation Subcommittee) は、すべての妥当性評価研究に対してガイダンスを提供し、監視する責務を負っている。

以上

Palmer A. Orlandi, Jr. Ph.D., 委員長
FDA FVM 科学研究運営委員会
OFVM チーフ・サイエンス官・研究部長

**FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価のためのガイドライン**

第 2 版

**米国食品医薬品局
食品・動物用医薬品部**

2015 年 4 月

FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

謝辞

2011年に発表された第1版ガイドライン及び2015年の第2版ガイドラインは、米国FDAの食品・動物用医薬品部の要請により作成された。科学研究運営委員会のメンバーと協同して、直接のアドバイス、評論及び承諾が、以下のFDA調査及び規制部により提供された:

食品安全・応用栄養センター

規制科学室 (Office of Regulatory Science)

食品安全室 (Office of Food Safety)

応用研究・安全性評価室 (Office of Applied Research and Safety Assessment)

動物用医薬品センター

調査室 (Office of Research)

新規動物薬評価室 (Office of New Animal Drug Evaluation)

規制業務部

規制科学室 (Office of Regulatory Science)

ORA 研究所 (ORA Laboratories)

FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

承認ページ

この文書は、FDA 食品・動物用医薬品(FVM) 科学研究運営委員会(SRSC)により承認されたものである。FVM SRSC のプロジェクト・マネージャは、変更要件が満たされた場合にはこの文書を更新し、必要に応じて SRSC 及び他の関係者に更新文書を発信する役割を負う。

承認者:

OFVM チーフ・サイエンス官・研究部長 (OFVM Chief Science Officer/Research Director)

CVM、科学政策担当副局長 (CVM, Deputy Director for Science Policy)

OFVM シニア科学アドバイザー (OFVM Senior Science Advisor)

CVM、調査室室長 (CVM, Director, Office of Research)

CFSAN、シニア科学アドバイザー (CFSAN Senior Science Advisor)

ORA、規制科学室室長 (ORA, Director Office of Regulatory Science)

CFSAN、規制科学室室長 (CFSAN, Director, Office of Regulatory Science)

ORA、食品及び飼料科学スタッフ室長 (ORA, Director, Food and Feed Scientific Staff)

CFSAN、応用研究・安全性評価室長 (CFSAN, Director Office of Applied Research & Safety Assessment)

ORA、科学諮問委員会委員 (ORA, Member of the ORA Scientific Advisory Council)

FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

米国食品医薬品局
食品・動物用医薬品部

FDA FVM プログラムのための化学分析法の妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

目次

1.0 緒言	6
1.1 目的	6
1.2 適用範囲	6
1.3 職務権限及び責務	6
1.4 分析法妥当性評価小委員会	6
1.5 発案元試験室の一般的責任	7
1.6 分析法妥当性評価の概要	7
1.7 適用可能性	7
1.8 要件	8
2.0 化学分析法の妥当性評価に関する基準及びガイダンス	9
2.1 一般的な妥当性評価ツール及びプロトコルガイダンス	9
2.2 参照分析法	10
2.3 性能特性	10
2.4 同定の確認	10
2.5 分析法妥当性評価レベル	11
2.6 許容基準	12
3.0 追加手続きガイダンス	14
3.1 プラットフォーム/装置拡張	14
3.2 分析成分拡張	14
3.3 食品マトリックス拡張	15
3.4 限度試験(一般的な半定量的スクリーニング法)	15
3.5 定性的広範囲分析成分スクリーニング	16
4.0 参考文献及び裏付けとなる文書	18
付録1—用語集	20
付録2—特定の性能特性に関する許容基準の例	25
A. 定量法許容基準	25
B. 定性法許容基準	26
付録3—妥当性評価計画の例	27
A. レベル1 妥当性評価における同一分析成分を有する他のマトリックスへの拡張	27
B. レベル2 妥当性評価における同一マトリックス内の類似の分析成分への拡張	27
C. 単一マトリックス及び単一分析成分に関するレベル2 妥当性評価	28

FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

付録4ー代表マトリックスの選択.....	29
A. 食品グループ及び代表食品.....	29
B. AOAC 食品マトリックスライアングル.....	31

1.0 緒言 INTRODUCTION

1.1 目的 Purpose

米国食品医薬品局(FDA)は、国内食品供給の約80%の安全性を確保する責務がある。FDA 試験室は、公衆衛生上の事故で汚染された食品や飼料が検出されるか又は疑われる場合、日常的監視プログラム、的を絞った規制分析、及び緊急対応を通じてこの任務に貢献している。これらの活動の効果は、規制遵守、調査及び規制施行の支援に必要とされる分析法の品質及び性能に大いに依存している。食品及び飼料の分析のために使用される化学分析法がそれらの意図された目的に適切で最も高い分析性能基準を満たすことを確実にするために、FDA 食品・動物用医薬品部(Office of Foods and Veterinary Medicine :OFVM)は、科学研究運営委員会(Science and Research Steering Committee :SRSC)を通じて、すべての食品・動物用医薬品(Foods and Veterinary Medicine:FVM)プログラムの化学分析法を評価・検証する基準を確立した。この文書は、食品及び飼料中の化学分析成分のための規制分析法の妥当性評価に使用する4つの標準レベルの性能を定義している。

1.2 適用範囲 Scope

これらの基準は、機関全体でのFVMプログラムの実施を想定した化学分析成分のための規制分析法の開発、及びその妥当性評価に参加する際にFDA 試験室に適用される。これらの基準は、動物用医薬品承認のように、成文化されたプロセス又は公式ガイダンス(例:連邦規則、CPGsなど)に従って開発された分析法、あるいはFDAに提出された分析法には適用されない。そのような研究においては、適切な動物用医薬品センター(Center for Veterinary Medicine :CVM)又は他のプログラムガイダンス文書に従わなければならない。このガイダンスは先験的な文書である。ここに記載された要件は、*新たに*開発された分析法及び既存の分析法に重大な変更がなされた場合にのみ適用される(「1.8 要件」の項を参照)。一旦分析法が適正なレベルで妥当性評価されると、その分析法は、分析法の開発、妥当性評価及び実施プログラムのための標準作業手順書を確立するOFVM文書、FDA-OFVM-3「分析法の開発、妥当性評価及び実施プログラム」に従って実施することができる[1]。例えば、多施設により妥当性評価された分析法が広範な法規制に使用される場合、その方法は、分析法検証試験(method verification)プロセスに従う他のFDA 試験室により実施することができる。しかし、分析法検証試験は、通常、地方の試験室の品質管理プロセスの一部であり、この妥当性評価文書の範囲内では考慮されていない。

1.3 職務権限及び責務 Administrative Authority and Responsibilities

分析法妥当性評価のためにこの文書において確立されたすべての基準は、OFVM及びSRSCにより採用され、承認されている。OFVM文書(FDA-OFVM-3)は、FVMプログラム[1]内の分析法開発及び妥当性評価活動の承認及び追跡のための標準作業手順書を確立している。単一試験室妥当性評価(Single Laboratory Validation :SLV)試験(レベル1及びレベル2妥当性評価の両方を含む)は、それぞれのセンター及び部署のライン部門管理組織により、完全に管理することができる。多施設妥当性評価(Multi-Laboratory Validation:MLV)試験(レベル3及びレベル4妥当性評価の両方を含む)の管理及び調整は、分析法妥当性評価小委員会(Methods Validation Subcommittees:MVS)の管轄である。

1.4 分析法妥当性評価小委員会 The Method Validation Subcommittee

SRSCの管理下で、化学分析法妥当性評価小委員会(Chemistry Methods Validation Subcommittee:CMVS)は、規制関係での使用を意図したFVMプログラムに関連する化学分析法を含むMLV試験の監督責任を有する。CMVSは化学研究調整グループ(Chemistry Research Coordinating Group:CRCG)の小委員会で、SRSC直属である。CMVSはその憲章[2]に詳述されている組織構造、役割及び責任によって管理される。つまり、CMVSは、発案

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

元試験室と協力して、FDA OFVM 事業で開発された化学分析法に関するすべての MLV 試験を監視・調整し、規制に関わる分析ニーズをサポートする。これには、提案された MLV 試験の評価及び優先順位付け、並びに完了した MLV 試験及び報告書の評価を含む。化学妥当性評価の提案、報告書、質問等の提出は、代表 E メールアカウント:

Chemistry.mvs@fda.hhs.gov

を介して CMVS に直接行うことができる。しかし、可能な場合は、要因を可能な限り広範に考慮することを担保するために、MLV に人的資源を投入する前に、適切な技術諮問グループにおいて、又は CRCG と MLV について議論することが望ましい。

1.5 発案元試験室の一般的責任 General Responsibility of the Originating Laboratory

この文書に記載されるすべての基準の適切な遵守を確実にすることは、発案元試験室の責任である。発案元試験室は、多施設妥当性評価プロセスの全体にわたって、CMVS 及び/又はその指定された技術諮問グループ (Technical Advisory Group: TAG) と協議して作業する必要がある。妥当性評価プロセスの全ての面で、それぞれの QA/QC マネージャーを含めることは、発案元試験室の責任となる。

1.6 分析法妥当性評価の概要 Overview of Method Validation

分析法妥当性評価とは、分析法がその意図された目的に適していることを実証するか又は確認するプロセスである。これらの分析法の目的は、定性分析、定量分析、スクリーニング分析、確認分析、限度試験、マトリックス拡張、プラットフォーム拡張、及び緊急/偶発事故作業を含むが、これらに限定されるものではない。意思決定するために結果が有意義でかつ適切であることを担保するために、妥当性評価は、精確さ、精度、感度、選択性、検出限界、定量限界、直線性、範囲及び堅牢性などの性能特性を実証することを含む。分析法妥当性評価は、分析法開発/最適化とは異なった段階であり、分析法開発の後に実施する必要がある。分析法は、一つ以上の分析成分、一つ以上のマトリックス、及び一つ以上の装置又はプラットフォームについて妥当性評価することができる。分析法は、分析法の性能を定義し、定量化するのに役立つ特定の性能特性を決定するための実験を行うことによって妥当性評価される。

1.7 適用可能性 Applicability

この文書は、FVM プログラムが対象とする食品、飼料及びその他の FDA 規制対象製品中の化学分析成分を検出するために広く用いられる規制分析法のための妥当性評価基準を確立するものである。規制対象製品は以下に掲げるものを含むがこれらに限定されない:

- 化学療法薬残留物
- 着色添加剤
- 分解生成物
- 栄養補助食品成分/偽和物(混ぜ物)
- 元素及び金属
- 食品及び飼料添加物及び防腐剤
- 食物アレルギー
- グルテン
- 意図的な偽和物(混ぜ物)/毒物
- マイコトキシン
- 栄養素
- 残留性有機汚染物質
- 農薬
- 魚介類及び植物毒素

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

毒性元素
残留動物用医薬品

これらのガイドラインは主に多施設妥当性評価に適用されるが、いくつかの妥当性評価レベルの基準が議論されており、それらは完全な MLV とは区別される点に注意されたい。1つの試験室による非常に限られた(おそらく1回の)使用を処理するために分析法が拡張されるような場合、従ってその分析法は機関全体の規制上の使用を意図していないため、低レベルで妥当性評価される状況も考えられる。例えば、単一の農薬試験室が、以前の分析法妥当性評価では扱われていなかった多成分残留物分析のための複数の新規な食品マトリックスを受け取った場合、これらのガイドラインは一般には要求されるものではなく、農薬プログラムのガイドライン中でより簡略化された妥当性評価(validation)/検証試験(verification)が許容される可能性もある。

1.8 要件 Requirements

分析法妥当性評価は、以下のために必要とされる:

- 新規又は独自の分析法の提出。
- 追加の分析成分を含めるための既存分析法の適用範囲の拡張。
- 追加のマトリックスを含めるための既存分析法の適用範囲の拡張。
- 既存の分析法の用途の変更(例:スクリーニングか、確認か)。
- 分析法の性能仕様を変更する可能性のある分析法に対する修正(例:精度及び精確さに著しく影響を及ぼす可能性がある修正、既存分析法の基礎科学に対する変更、試薬・器具・装置パラメータ・試料調製及び/又は抽出の著しい変更、又は妥当性評価レベルを越えた分析法範囲の変更)。更なる妥当性評価を必要としない許容可能な変更のいくつかの例は、ORA-LAB.5.4.5 付録 A-修正基準 [3]に提供されている。

2.0 化学分析法の妥当性評価に関する基準及びガイダンス CRITERIA AND GUIDANCE FOR THE VALIDATION OF CHEMICAL METHODS

2.1 一般的な妥当性評価ツール及びプロトコルガイダンス General Validation Tools and Protocol Guidance

化学分析法の分析法妥当性評価に関する詳しい情報を提供する、多くの優れた参考文献及びガイドが利用可能である[3-20]。以下に、分析法性能を評価するために用いるべきいくつかの一般的ガイドライン/ツールを示す：

一般的プロトコル (General Protocol) :分析法妥当性評価レベルの項及び下記の表1で一般的に記載されるように、既知濃度の分析法ブランク、マトリックスブランク、参照物質(入手可能な場合)及びマトリックススパイク(利用可能な場合はマトリックスブランクを使用)を準備して分析する。精確さ又はバイアス及び精度が、これらの結果から計算される。データはまた、試料マトリックスの変化に起因する分析法のマトリックス効果及び堅牢性/頑健性を評価するためにも用いられる。

後述する「性能特性 (Performance Characteristics)」の項で説明するように、分析法の性能特性を作成するためには、以下の一般的妥当性評価ツールが用いられるべきである。

ブランク (Blanks) :様々なタイプのブランクを使用することは、得られた結果の内どの程度が、他の発生源に関連して、分析成分に起因しているかを評価することを可能にする。ブランクは検出限界の決定に有用である。

参照物質及び認証標準物質 (Reference materials and certified reference materials) :既知の参照物質(利用可能で適用可能な場合)の使用は、分析法の精確さ又はバイアスの評価、ならびに干渉に関する情報を得るために組み込まれるべきである。

マトリックスブランク (Matrix Blank) :この種のブランクは、マトリックス成分に関して分析される試料と厳密に一致する物質である。マトリックスブランクは、分析成分のバックグラウンドレベル(有無)を確立し、試料マトリックス及び装置が分析信号に干渉しないか、又は影響しないことを確認するために用いられる。

マトリックススパイク (試験室添加マトリックス) [Matrix Spikes (Laboratory Fortified Matrix)] :回収率測定は、既知量の分析成分をスパイクし、添加回収率を算出することで推定できる。(注:添加回収率は、自然に生じた分析成分の回収率を正確に反映しているとは限らない。)これらの試料で、マトリックス効果も評価することができる。精確さ又はバイアス及び精度が、これらの結果から計算される。データは、また、試料マトリックスの変化に起因する分析法の頑健性を評価するために用いることもできる。

実残留試料 (Incurred Samples) :この種の試料(入手可能な場合)は、対象となる分析成分(試験室添加ではない)を含み、精度及びバイアスを評価するために用いることができる(分析成分濃度が高い信頼性で既知である場合)。分析成分の回収率はまた、試料の連続抽出及び/又は既知のバイアスを有する他の分析手順との比較により評価することができる。

試薬ブランク (Reagent Blank) :この種のブランクは、分析法で使用するすべての試薬を組み込んだもので、すべての試料処理操作を受ける。これは、試薬が分析成分を含まないこと、及び使用装置が分析信号に干渉しないか又は影響を及ぼさないことを確認するのに役立つ。

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

繰り返し分析 (Replicate Analyses): 分析過程の精度は、反復分析により評価することができる。発案元試験室は、適切な試料複製が行われ、各分析成分の反復測定の結果が比較されることを保証すべきである。最小限、分析法の併行精度は評価されることが望ましい。

干渉(妨害) (Interferences): スペクトル干渉、物理的干渉及び化学的干渉は、様々な疑わしい干渉物質を含んだ試料を分析することにより評価することができる。キャリーオーバーは、標準物質と試料の直後にブランクを組み込むことにより評価することが望ましい。

統計 (Statistics): 精確さ、真度(又はバイアス)、精度、直線範囲、検出限界、定量限界、及び測定不確かさを評価するために統計的手法が用いられる。

2.2 参照分析法 Reference Method

参照分析法は、それにより代替分析法又は新規分析法の性能を測定又は評価することができる分析法である。化学分析成分については、必ずしも適切な参照分析法が特定又は利用可能ではない。しかしながら、輸出管理規定で使用するために指定された分析法を置き換える場合など、参照分析法の使用が適切である場合がいくつかある。参照分析法の使用が必要かどうか決定する際には、発案試験室と CMVS 及びプログラム事務局 (Program Office) 間で協議することを勧める。

2.3 性能特性 Performance Characteristics

分析法を妥当性評価するために評価すべき性能特徴は、分析法の使用目的、分析法の種類(例: 定量的か、定性的か)、及びそれが以前に妥当性評価された程度(例: マトリックス拡張、分析成分拡張、プラットフォーム拡張)に応じて変化する。これらの特性の定義は付録 1 に含まれているが、この文書は、分析法の検出レベル、検出限界又は定量限界などの特性を計算する様々な方法を扱うことを意図するものではない。

新規定量分析法の妥当性評価のための性能特性: 新規定量分析法の妥当性評価は、次の性能特性について最低限評価すべきである: 精確さ、精度、選択性、検出限界、定量限界、直線性(又は他の較正モデル)、適用範囲、測定不確かさ、堅牢性、同定の確認、及び添加回収率。

新規定性分析法の妥当性評価のための性能特性: 新規定性分析法の妥当性評価は、最低限次の性能特性について評価すべきである: 感度、選択性、偽陽性率、偽陰性率、最小検出濃度、堅牢性、及び同定の確認。

分析法拡張の妥当性評価のための性能特性: 以前に妥当性評価された分析法の拡張について妥当性評価するには、その拡張の目的を慎重に評価する必要がある。試料調製及び/又は抽出手順/分析法が既存の試験手順から修正される場合、その変更が得られるデータの精度及び精確さに悪影響を及ぼさないことを実証すべきである。修正された方法を実施するために、一般的にはまず初めに標準又は既存の分析法が実施される。その後、既存の分析法と比較することにより、修正された方法の性能が検証される。

2.4 同定の確認 Confirmation of Identity

各分析成分の同定の確認は、規制施行のための分析法妥当性評価の一部として、定性及び定量分析法の両方について検証されなければならない。明白な同定の確認は、通常、妥当性評価対象の新規分析法の適用範囲内の各分析成分の主要な特徴を、例えば質量スペクト

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

ルフラグメンテーションパターンによるか、又は独立した分析を用いて得られた結果と一致していることを実証することにより、分析的に確認することを必要とする。

FDA は、標的分析成分の同定の確認をするための質量分析法の開発、評価及び適用に関するガイダンス文書を公表した。そのような文書としては、CVM 産業向けガイダンス 118 (CVM Guidance for Industry 118)「残留動物用医薬品の同定の確認のための質量分析法 (Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues) [4]」と、ORA-LAB.010「農薬残留に対する規制措置を支持するための分析と文書に関するガイダンス (Guidance for the Analysis and Documentation to Support Regulatory Action on Pesticide Residues) [4]」がある。残留動物用医薬品分析法では、CVM ガイダンスに従う必要がある。ORA-LAB.010 文書は、特に農薬分析用に書かれた。食品中の他の種類の化学汚染物質 (例: 食品添加物、マイコトキシンなど) については、CVM 文書に従うべきである。なぜなら、当該文書は産業向けガイダンスとして書かれたものであり、従って内部的及び外部的により広く評価され、配布されているからである。さらに、OFVM は、現在、高分解能質量分析の使用及び精密質量測定データの評価に特に対応した、CVM 産業向けガイダンス 118 への補足資料の原案を作成している。

2.5 分析法妥当性評価レベル Method Validation Levels

食品中の化学分析成分に関する規制分析法の分析法妥当性評価のために定義された、4つの標準レベルの性能について以下に説明する。このアプローチは、食品緊急対応ネットワーク (Food Emergency Response Network: FERN) の SOP No: FERN-ADM.0008.00「FERN 化学物質、微生物及び放射線分析法に関する妥当性評価ガイドライン (FERN validation Guidelines for FERN Chemical, Microbiological, and Radiological Methods) [6]」、並びに AOAC の単一試験室妥当性評価のためのガイドライン[7]、及び共同試験[8]に基づいている。各レベルの主要な妥当性評価パラメータは、表 1 にまとめられている。単一試験室妥当性評価までに、及び単一試験室妥当性評価を通して要求される適切な妥当性評価レベルの決定は、発案元 (開発元) 試験室の責任である。適正な妥当性評価レベルを決定する際には、発案元試験室は適切な技術諮問グループと協力することが強く推奨される。

注: すべての分析法が、最高レベルまで妥当性評価される、又はされなければならないというわけではない。

レベル 1

これは、最低レベルの妥当性評価要件を有する単一試験室の妥当性評価レベルで、緊急時/限定使用に適している。この最初の精査レベルで、分析法の性能は、更なる妥当性評価が有用か又は保証されるかどうか部分的に判断される。

使用目的: 緊急/限定使用/マトリックス拡張/分析成分拡張/プラットフォーム拡張。レベル 1 妥当性評価が許容される可能性がある例としては、単独事例としての消費者からの苦情、単発の試料、及び過去において食品安全又は公衆衛生に対する実際の又は仮定の脅威に対応するよう妥当性評価されていないマトリックスに対して、特定の分析成分のために開発された分析法の適用がある。新規マトリックスを用いた分析法性能の妥当性評価は、新規マトリックスが分析法の適用範囲のすべての分析成分について正確で信頼性の高い結果を与えることを保証することを目的とする。一般に、このマトリックスにおいて、規制を目的とした広範な使用が予想される場合、やはりすべての対象分析成分がこのレベルでマトリックススパイクに含まれなければならない。マトリックス拡張、分析成分拡張又はプラットフォーム拡張/緊急時使用のための分析法の最初のレベルの妥当性評価として、少なくとも下記のレベル 2 に相当する、より厳密な単一試験

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

室妥当性評価が、より広範囲の非緊急性の規制に使用する前に実施されることが期待される。

レベル 2

これは単一試験室の妥当性評価レベルである。発案元試験室は、AOAC 単一試験室妥当性評価試験と類似の性能基準で包括的な妥当性評価試験を実施している。適切であれば、既存の参照分析法との比較が実施されている。この試験の判定基準のいくつかは、AOAC 単一試験室妥当性評価試験より低いレベルかもしれないが、現在のところ開発中の分析法には適切である。

使用目的: 日常的な規制試験、緊急ニーズ、軽微な分析法変更、スクリーニング法の分析成分拡張及びマトリックス拡張。このレベルで検証された分析法が、広く、長期間にわたり、一般に認識されるか、又は国際貿易紛争に関与する事が予想される使用が期待される場合は、その妥当性評価は少なくとも下記のレベル 3 まで広げるべきである。

レベル 3

これは多施設妥当性評価レベルである。レベル 3 妥当性評価は、発案元試験室に加えて最低 1 つの共同試験室を使用する。発案元試験室が従う基準の大部分は、完全な AOAC 共同試験のレベルと同様のレベルにあり、利用可能で適切な場合には、既存の参照分析法との比較を伴う。追加の共同試験室は、AOAC 共同試験で見いだされた多くの基準に従う。主な違いは、レベル 3 妥当性評価は、AOAC で用いられる 8~10 の代わりに、少なくとも 1 つの追加の共同試験室を使用すること、及び各食品マトリックス/添加レベルごとにより少ない反復試験で済むことである。

使用目的: この精査レベルまで妥当性評価される分析法は、スクリーニング分析、確認分析、規制に関する調査、及び規制対応支援を含む、すべての規制関連の状況に使用することができる。もしその分析法が、広く、長期間にわたり、一般に認識されるか、又は国際貿易紛争に関与することが予想される使用が期待される場合、その妥当性評価をレベル 4 まで広げることが適切かもしれない。

レベル 4

この妥当性評価レベルは、完全な AOAC 又は ISO 共同試験と同等の基準を有する。この妥当性評価レベルに達しているいかなる分析法も、完全共同試験された分析法として AOAC により採用されるために提出することができる。

2.6 許容基準 Acceptability Criteria

分析法妥当性評価の性能基準には、方法論の適用又は使用目的、及び特に懸念レベル、対策レベル、又は化学分析成分に対する残留基準値に応じて、様々な許容範囲がある。様々な国内及び国際機関で使われている許容範囲のいくつかの例及びそれらの出典を付録 2 に示す。付録 2 に示すように、許容される添加回収率は、分析成分濃度によって変化する(例: 1 µg/g (ppm) 濃度における定量分析法では、回収率は約 80~120% の範囲に収まる可能性がある)。繰り返し性(併行精度)及び再現性(再現精度)もまた、分析成分濃度によって変化する。付録 2 の許容範囲は、分析法開発者及び MVS におおよその目標範囲を提供するものであり、厳しい拘束力のあるガイドラインでない。困難なマトリックス、分析成分濃度が極めて低い(例: 塩素化ダイオキシン、残留性有機汚染物質)、多成分残留物分析法及び緊急事態などのようないくつかの状況では、これらの一般的な許容範囲は、達成できなくても良いかあるいは必要でなくなる可能性がある。

**FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)**

表 1. 化学分析法の主要な妥当性評価パラメータ要件

	レベル 1: 緊急/ 限定的使用	レベル 2: 単一試験室 妥当性評価	レベル 3: 多施設 妥当性評価	レベル 4: 完全共同試験
参加試験室数	1	1	≥ 2	8(定量) 10(定性)
マトリックスソースの数(マトリックス 当たり)*	≥ 1	≥ 3(可能な場合、 推奨)	≥ 3(可能な場合、 推奨)	≥ 3(可能な場合、 推奨)
分析成分の添加レベル数 (少なくとも 1 つのマトリックスソ ースに対して)**	≥ 2 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク	≥ 3 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク	≥ 3 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク	≥ 3 スパイク レベル + 1 マトリックス ブランク
必要な繰り返し数 (試験室ごとにテストされた各レ ベルでのマトリックスソース当た り)	≥ 2(定量) ≥ 2(定性)	≥ 2(定量) ≥ 3(定性)	≥ 2(定量) ≥ 3(定性)	≥ 2(定量) ≥ 3(定性)
必要な繰り返し数 (用いられるマトリックスソースが 1 つのみの場合、試験室ごとにテ ストされた各レベル当たり)	≥ 4(定量) ≥ 6(定性)	≥ 6(定量) ≥ 9(定性)	≥ 3(定量) ≥ 6(定性)	≥ 2(定量) ≥ 6(定性)

* 異なる物理化学特性を有する様々な食品マトリックスが選択される場合、各食品試料マトリックスのソース数は 1 つ以上である可能性があるが、もし 1 つの食品マトリックスしか試験されない場合には、入手可能であるならば 3 つ以上のソースが推奨される。添加レベルとマトリックスの組合せの総数が適切な場合(例:各添加レベルにおいて定量分析法では 6 つ以上、定性分析法では 9 つ以上の繰り返し試験)に限り、特にブランクのマトリックスソースを得ることが困難な場合は、マトリックスソース数を減らしてもよい。

** 添加レベル数は、マトリックスの少なくとも 1 つのソースに対して推奨される。マトリックスの他の同様のソース(例:同じカテゴリー内、付録 4 参照)は、1 つ又は 2 つの添加レベル(例:対策/指導又は許容レベル、又は定量/検出限界付近)で試験されてもよい。

3.0 追加手続きガイダンス ADDITIONAL PROCEDURAL GUIDANCE

前出の表 1 に記載された標準的定量及び定性分析法のための基準に加えて、特定の種類の分析法又は妥当性評価状況のための追加のガイダンスを本セクションにおいて提供する。

3.1 プラットフォーム/装置拡張 Platform/Instrumentation Extension

妥当性評価済み分析法の使用を拡張して他の大幅に異なる機器又はプラットフォームを組み込むためには、更なる妥当性評価が必要である。そのような事例としては、現時点で妥当性評価され、使用が承認されているものと適用範囲及び機能の点で同様である機器又はプラットフォームの使用が含まれる。ただし、その様な場合は、構成又は検出方式に大きな違いがあることがある。

プラットフォーム拡張の妥当性評価は、一般に、表 1 のレベル 2 を参考にして実施することが望ましく、提案された新規プラットフォームを参照分析法で使用するプラットフォームと比較することが望ましい。プラットフォーム拡張の妥当性評価を計画する際には、2 つのプラットフォームで得られた結果間の相互相関がどの程度許容できるのかを判断しなければならない。

例:

分析法 A は、ガスクロマトグラフ-単一四重極質量分析計(GC-MSD)を用いた農薬のスクリーニングのための妥当低評価された分析法である。ガスクロマトグラフ-三連四重極質量分析計(GC-QQQ)は、感度、選択性及び適用範囲に関して、GC-MSD プラットフォームに対して一定の利点を提供する。この場合、同等の結果を確保するために、比較する分析法拡張の妥当性評価が必要である。しかしながら、新規プラットフォームの使用を介して新規分析成分が分析法の適用範囲に加えられる場合、新規分析法妥当性評価は GC-QQQ 法に対して示される。

分析法 Z は、蛍光検出器付き液体クロマトグラフィ(LC-FLD)を用いた魚介類中の多環芳香族炭化水素のスクリーニングのために妥当性評価された分析法である。ある試験室が、この分析法をダイオードアレイ検出器のみを使用する液体クロマトグラフィシステム(LC-DAD)へ移行することを望んでいる。この場合、新規検出システムが当初妥当性評価された分析法と同等の結果を与えることを確保するために、比較する分析法拡張の妥当性評価が必要である。

3.2 分析成分拡張 Analyte Extension

多成分残留分析法、マルチクラス分析法がより一般的になっている。これらの分析法の多くは、半定量的(限度試験)又は定性的広域スクリーニングである。この種の手順に関する性能要件を以下に示す。しかしながら、多成分残留分析法を定量に用いることを意図する場合、単一分析成分分析法に必要とされるものと同じ性能特性(精確さ、精度、選択性、検出限界、定量限界、直線性範囲、不確かさ及び堅牢性)が、各分析成分に対して評価されることが望ましい。大規模な多成分残留分析法では、すべての分析成分が付録 2 にリストされた推奨許容範囲を満たすというわけではないものと理解されが、各化合物について性能を試験して、特定の分析成分について精確さ及び精度が既知であり、分析法の意図された目的には十分であることを報告することが望ましい。

新規分析成分が定量的多成分残留分析法に追加される場合、新しい化合物の添加が装置条件(例:他の溶出分析成分のためのデューティサイクル又はスキャンレート)の性能に影響を及ぼさないこと、及び分析成分が他の試験された分析成分の安定性に、化学的又は物理的相互作用を示さないことを確認するための試験を実施すべきである。

3.3 食品マトリックス拡張 Food Matrix Extension

新規マトリックスによる分析法性能の妥当性評価は、分析法が正確で信頼性が高い結果を生成し続けることを保証することを目的とする。緊急マトリックス拡張(表1のレベル1)は、妥当性評価された分析法に、食品安全又は公衆衛生に対する実際のもしくは脅かされた脅威に対応するように事前に妥当性評価されていないマトリックスを用いる場合を意図しており、このような緊急事態では、MVSに助言が求められることは想定されていない。妥当性評価された分析法のマトリックス拡張は、規制の適用範囲を拡大することを目的とし、繰り返しに基づく適応性は、表1のレベル2妥当性評価に最小限該当する。このセクションは、これらの食品が機関全体におけるテストに含まれることを前提として、妥当性評価された分析法をマトリックスに拡張するためのガイダンスを提供する。分析法開発者は、マトリックス拡張に関するレベル2妥当性評価のいかなる作業を開始する前でも、適切な技術諮問グループ又はMVSと相談されたい。

新規食品マトリックスが、定義済み分析成分について以前に妥当性評価されたマトリックスにより密接に関連している程、新規マトリックスは同様に挙動する確率が高くなるのが一般に想定される。また、FDAで採用されている規制化学分析法が、広範囲のマトリックスを代表する多様な製品を分析するために用いられることも、通常見られるケースである。分析法の適用範囲を拡張するために、単一マトリックスそれぞれについてマトリックス拡張妥当性評価を行うことは実行不可能になる。一群の製品マトリックスへの分析法の適用可能性を実証するより合理的なアプローチは、製品の異なる「カテゴリー」について分析法の妥当性評価を行うことである。例えば、多成分残留農薬分析法は、「高糖分」、「高脂肪分」、「高水分」、「乾燥物」及び「高タンパク質」マトリックスについて妥当性評価することができる。付録4は、食品カテゴリーに関するガイダンスを示すとともに、各カテゴリーの代表的なマトリックスの例を示す。

妥当性評価されるべき異なる食品カテゴリーの数は、その分析法の適用可能性及び使用目的に依存する。分析法が1つのカテゴリーのみに特有である場合は、1種類の食品のみ含まれればよい。適用可能性がより広い場合(例:加工食品中のフタル酸エステルの検出)、すべての予想されるマトリックスを代表するよう、適切な数の食品カテゴリーを含めるべきである。妥当性評価されるカテゴリーの数に応じて、最低1~3つの代表的なマトリックスを各カテゴリーから選択する必要がある。

3.4 限度試験(一般的な半定量的スクリーニング法) Limit Tests (common semi-quantitative screening method)

定性分析法の1つの特定のカテゴリーとして、定義済みの懸念レベルを有する分析成分に対する限度試験(バイナリ試験又はパス/フェイル試験)がある。これらのスクリーニング法の目的は、分析成分が懸念レベルの近く又はその上の濃度で存在するかどうかを判定することである。これは、任意のレベルで分析成分の有無を判定することを目的とするスクリーニング法とは対照的である。限度試験妥当性評価は、懸念レベルにおける分析成分についての分析法の精度の測定を含まなければならない。

限度試験スクリーニング法は、一般に、分析結果の5%未満の偽陰性率を有する偽陰性を避けることが望ましい。偽陽性の発生は、推定的な陽性が定量的分析法又は確認分析法によって更に分析されるので、あまり重要ではない。しかし、不必要な確認分析を回避するために、偽陽性率は通常10~15%未満である事が望ましい。理想的には、限度試験は多数の試料を迅速にスクリーニングして、追加の分析の必要性を最小限にすることができる。限度試験スクリーニング法で用いられる一般的なアプローチは、信頼区間を用いて試験室の閾値又はカットオフ値を設定することにより、その値より上の応答のみが更なる試験を必要とするようにすることである。機器応答に基づく限度試験の場合、閾値又はカットオフ値は、応答の標準偏差又

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

は懸念レベルの分析成分を添加した試料中の分析成分濃度の推定値に基づいて、信頼限界により決定することができる。

例:

乳試料(n=21)が、懸念レベル(10 ng/mL)のスルファメタジンを添加された。LC-MS/MS 限度試験スクリーニング法が、抽出された乳試料中のこの薬物を測定するために用いられた。平均検出濃度は 10.99 ng/mL で、標準偏差は 2.19 であった。10 ng/mL 以上のスルファメタジンを含有する試料の 95%が閾値を超える応答を有するように、閾値又はカットオフ値が算出された:

$$\begin{aligned}\text{閾値} &= [\text{平均濃度} - (t * \text{標準偏差})] \\ &= [10.99 - (1.725 * 2.19)] = 7.21 \text{ ng/mL}\end{aligned}$$

ここで、 t は 95%信頼水準における自由度 $n-1$ の片側スチューデントの t 値。

このアプローチは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)又は光学的バイオセンサアッセイなどの免疫吸着アッセイにも用いることができる。これらの試験は非競合的(分析成分応答の直接測定)又は競合的(間接測定)であっても良い。競合的免疫吸着試験からのデータの分析は、観察された応答が分析成分濃度の増加と共に減少するという事実を説明しなければならない。従って、閾値又はカットオフ値より低い応答は、推定上の陽性応答とみなされる。免疫吸着アッセイでは、ブランクマトリックス試料について観測される応答を測定し、ブランクの応答が閾値の応答と(統計学的に)区別可能であることを検証することも重要である。

限度試験の性能特性:

新規限度試験の妥当性評価は、最低限、以下の性能特性の評価を含むことが望ましい:感度、特異性、精度、閾値又はカットオフ値、偽陽性率、偽陰性率、最小検出濃度(閾値/カットオフ値より低くすべきである)、及び堅牢性/頑健性。

3.5 定性的広範囲分析成分スクリーニング Qualitative Broad-band Analyte Screening

多くの化合物を検出できる広範囲分析法が、FDA 試験室における化学汚染物質試験の一環として、最初のスクリーニング段階としてより頻繁に利用されている。これらの分析法は、通常、質量分析法を含み、定性的情報を提供する。例えば、得られたデータは、コンパイルされたライブラリ中に精密質量数及び分子式情報又はスペクトルを有する化合物データベースのような、確立されたリファレンスと比較することができる。規制措置のためには、このスクリーニングからのいかなる陽性所見も、ターゲット分析法(例えば LC-MS/MS 又は GC-MS/MS プラットフォームを使用)によって確認されることが望ましい。

一般的に、これらの分析法の初期妥当性評価は、限定された代表的分析成分及び代表的マトリックスのセットを使用して実施される。例えば、関心領域(例:農薬、残留動物用医薬品、又は一般の化学毒素)の様々な化合物群からの化合物を含む分析成分のセットが、代表的なマトリックスを用いた分析法で試験される。評価される可能性のある性能特性としては、感度、選択性、偽陽性率、偽陰性率、最小検出濃度、堅牢性、同定の確認がある。分析法の性能は、化合物の種類が異なると変化するかもしれないことは理解されるが、分析法の能力の初期評価をすることが重要である。

試験室は、様々な情報源を通じて着目することになった新規分析成分を追加することにより、これら広範囲分析法の適用範囲を拡大し続けている。加えて、得られたデータを参照データベースと比較した後で、試料中に新規化合物が発見されるかもしれない。このような場合、スクリーニング法により分析成分を確実に検出することができる事の何らかの検証試験が必要で

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

ある。新規化合物が定性分析法の適用範囲に加えられるときには、この化合物が広範囲分析法に関してすでに妥当性評価された化合物群に帰属するかどうかを、最初に決定しなければならない。もし新規化合物が分析法の適用範囲内の既存の化合物群と化学的特性を共有する場合は、分析成分がその分析法によって効果的に検出できるかどうか判断するために、いくつかの代表的なマトリックスを選択し、単一水準の添加をこれらの代表的マトリックスに二併行で行い、再現性のある回収率が得られることを判断することで十分かもしれない。完全な妥当性評価を必要とするかもしれないシナリオとしては、適用範囲内にある既存の化合物群のいずれによっても代表されない新規分析成分を、広範囲分析法の適用範囲に追加する場合がある。また、新規分析成分がその化学的特性のために抽出手順の変更を必要とする場合も、このガイダンスで推奨されているように、その化合物を適用範囲に含めることは、完全に妥当性評価されるべきである。

広範囲分析法による陽性所見は、ターゲット分析法を用いた確認試験の対象であるが、広範囲分析法が偽陰性所見の数を増加させることがないことを、適切な妥当性評価及び検証試験プロトコルで判定することは依然として重要である。ここで偽陰性とは、分析法がその適用範囲の残留物を、その残留物がマトリックス内に懸念レベル又は最少検出濃度以上で存在するときに、検出に失敗することを意味する。広範囲分析法による陽性所見が更なる分析及び精査の対象となる一方で、陰性所見はその旨是認され、これらの結果に基づいて、例えば製品を流通に回すといった、規制に係る決定が成される。

4.0 参考文献及び裏付けとなる文書

[1] Food and Drug Administration, Office of Foods and Veterinary Medicine, “Methods Development, Validation and Implementation Program”, Document #: FDA-OFVM-3. Effective Date 10/16/2014.



Methods
Development-Validatio

[2] Food and Drug Administration, “FDA Office of Foods and Veterinary Medicine Method Validation Subcommittee Charter”, 3/19/2014.



SRSC Method
Validation Subcommit

[3] Food and Drug Administration, “Methods, Method Verification and Validation”, Laboratory Manual, ORA Laboratory Procedure, Volume II, ORA-LAB.5.4.5. 2014.12.12 アクセス.
<http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/LaboratoryManual/UCM092147.pdf>

[4] Food and Drug Administration, “Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues”, Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry #118, 2003. 2014.12.12 アクセス.
<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052658.pdf>

[5] Food and Drug Administration, “Guidance for the Analysis and Documentation to Support Regulatory Action on Pesticide Residues”, ORA-Wide Procedure, ORA-LAB.010. Effective Date 11/06/2009. 2014.12.12 アクセス.
<http://inside.fda.gov:9003/downloads/ORA/OfficeofRegionalOperations/DivisionofFieldScience/UCM254490.pdf>

[6] Food Emergency Response Network (FERN), SOP No: FERN-ADM.0008.00, “FERN Validation Guidelines for FERN Chemical, Microbiological, and Radiological Methods”, 06/22/2010. eLEXNET から入手可能.

[7] AOAC International, “Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Part 1 AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals”, 2013. 2014.12.4 アクセス. http://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf

[8] AOAC International, “Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis”, 2005. 2014.12.4 アクセス.
http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/Standards Development/eoma_appendix_d.pdf

[9] AOAC International, “Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements”, 2012. 2014.12.4 アクセス. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

[10] Codex Alimentarius, Codex Alimentarius Commission, Procedural Manual, Twenty-second ed., “Principles for the Establishment of Codex Methods of Analysis”, 2014. 2014.12.4 アクセス. <http://www.fao.org/3/a-i3243e.pdf>

FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

- [11] ISO, “Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results”, Parts 1-6, International Standard ISO 5725-1:1994, 5725-2:1994, 5725-3:1994, 5725-4:1994, 5725-5:1994, and 5725-6:1994. 2014.12.10 ダウンロード.
- [12] B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A laboratory(試験室) Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-9187461-59-0. 2014.12.9 アクセス. www.eurachem.org
- [13] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood. “Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis”, (IUPAC Technical Report) *Pure and Applied Chemistry*, 2002, 74, 835 - 855.
- [14] European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, “Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed”, SANCO/12571/2013, 19 November 2013 rev. 0. 2014.12.9 アクセス. http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf
- [15] JCGM 200:2012, International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM), International Bureau of Weights and Measures. 2014.12.9 アクセス. http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf
- [16] Codex Alimentarius Commission, “Guidelines on Analytical Terminology”, Standard CAC/GL 72-2009. 2014.12.9 アクセス.
http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/11357/cxg_072e.pdf
- [17] ISO, “Statistics-Vocabulary and Symbols-Part 2: Applied Statistics”, International Standard ISO 3534-2:2006, 2014.12.10 ダウンロード.
- [18] Codex Alimentarius Volume 3 “Residues of Veterinary Drugs in Foods”, 2nd ed. (1993), Joint FAP/WHO Food Standards Program, FAO, Rome Italy, p 59.
- [19] W.R. Wolf, and K.W. Andrews, “A System for Defining Reference Materials Applicable to All Food Matrices”, *Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry*, 1998, 352, 73-76.
- [20] K.E. Sharpless, R.R. Greenberg, M.M. Schantz, M.J. Welch, S.A. Wise, and M. Ihnat, “Filling the AOAC Triangle with Food-Matrix Standard Reference Materials”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378, 1161-1167.

付録1—用語集

この用語集の作成には、全般的に参考文献 13-17 が利用された。

精確さ Accuracy: 試験結果と受け入れられた参照値との一致の近さ。試験結果に適用されるとき、精確さは無作為誤差及び系統誤差の組合せを含む。分析法に適用されるとき、精確さは真度及び精度の組合せを指す。

対策レベル Action level: 試料サンプル中で、確実に同定又は定量されなければならない分析成分に関する懸念又は目標レベル。

分析成分 Analyte: 分析法によって、試験試料中で測定及び/又は同定される化学物質。

分析バッチ Analytical batch: 分析バッチは、同一の分析シーケンス及び同一ロットの試薬、及び各サンプルに共通の操作で同時に(通常 1 日以内に)又は連続したシーケンス時間で、共に分析される試料、標準物質及びブランクから成る。

バイアス Bias: 試験結果の期待値と真値又は受け入れられた参照値との差。バイアスは総系統誤差であり、一つ又はそれ以上の系統誤差成分がバイアスに関与している可能性がある。

ブランク Blank: 関心ある分析成分を含まず、通常の測定プロセスに供される物質。ブランクは更に、m、マトリックスブランク、試薬ブランク、装置ブランク、及びフィールドブランクに分類することができる。

校正 Calibration: 測定/検出システムにより生成され観察された分析成分信号と、測定された試料中に存在する分析成分量との間の関係を決定すること。一般的に、これは、既知量の分析成分を含む校正用標準を用いることにより達成される。

校正用標準 Calibration Standard: 測定/検出システムを校正するために用いられる、既知量又は既知濃度の分析成分。特定の試料マトリックスに合致したマトリックスである可能性がある。

キャリーオーバー Carryover: 分析システム中に保持され、その後の試料で測定される、以前の試料又は標準物質由来の残留分析成分。メモリとも呼ばれる。

認証標準物質 Certified Reference Material (CRM): 認定機関の発行の文書(証明書)が添付された参照物質であり、妥当な手続きを用いて関連した不確かさ及びトレーサビリティを伴う 1 つ以上の規定された特性値を提供する。注: 標準参照物質(Standard Reference Material: SRM)は、米国立標準技術研究所(National Institute of Standards and Technology: NIST)により作成、配布されている CRM の商標である。

チェック分析 Check Analysis: 最初の分析の結果と比較される第 2 の独立した分析の結果。一般的に、チェック分析は同じ分析法を用いて異なる分析者により実施される。

同定の確認 Confirmation of Identity: 質量分析などの非常に特異的な手法、又は 2 つ以上の独立した分析結果の一致を実証することによる分析成分の明確な同定。

確認分析/確認分析法 Confirmatory Analysis/Method: 最初の分析又はスクリーニング分析の結果を確認するために用いる独立した分析/分析法。スクリーニング結果の確認には、しばしば異なる分析法が用いられる。

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

カットオフ濃度 Cut-off Concentration: 定性分析において、統計的に懸念レベルより低い(限度試験の場合)か、あるいは陽性の同定をやめる(同定の確認試験の場合)、分析成分の濃度。閾値の項も参照。

偽陰性率 False Negative Rate: 定性分析において、実際には、分析成分が存在するか又は閾値もしくはカットオフ濃度より大きい量で存在するとき、分析成分が存在しないことを試験結果が示す頻度の尺度。

偽陽性率 False Positive Rate: 定性分析において、実際には、分析成分が存在しないか又は閾値もしくはカットオフ濃度より少ない量で存在するとき、分析成分が存在することを試験結果が示す頻度の尺度。

目的適合性 Fitness for Purpose: 測定プロセスによって生成されたデータが、ユーザが所定の目的のために技術的及び管理上の正しい決定を下すうえで、どの程度有用かを示す度合い。

指導レベル Guidance Level: 試料中で確実に同定又は定量されなければならない、良好な指導の実践の下で発行された懸念レベル又は対策レベル。

実残留試料 Incurred Samples: 試験室添加から由来するものではなく、外因性暴露又は内因性起源などの発生源に由来する対象の分析成分を含む試料。外因性暴露は、例えば農薬使用、動物による摂取、又は環境曝露を含む。

干渉(妨害) Interference: 分析成分以外の物質により生成された陽性又は陰性の応答又は応答への影響。スペクトル干渉、物理的干渉及び化学的干渉を含み、結果として分析成分の測定の確かさあるいは精確さが低くなる。

中間精度 Intermediate Precision: 可変条件(例:異なる日、異なる分析者、及び/又は異なる装置)下で得られた試験室内精度。

内標準 Internal Standard: 分析成分の定量を容易にするために、分析の特定の段階で既知量で試料に添加される化学物質。内標準は、マトリックス効果、不完全な添加回収率などを修正するために用いられる。分析成分濃度は、その応答を内標準により生成された応答と比較することにより推定される。内標準は、分析成分に類似の物理化学的性質を有するべきである。

試験室添加マトリックス Laboratory Fortified Matrix: マトリックススパイクを参照。

懸念レベル Level of Concern: 懸念レベルは、試料が違反と見なされる前に超えなければならない試料中の分析成分の濃度である。この濃度は、規制の許容量、安全レベル、対策レベル、指導レベル、又は試験室性能レベルとすることができる。

検出限界 Limit of Detection (LOD): 確実にゼロと区別できる分析成分の最少量又は濃度。この用語は、通常、検出システムの応答に限定され、しばしば「Detection Limit」と呼ばれる。全部が揃っている分析法に適用されるとき、これはしばしば分析法検出限界(Method Detection Limit :MDL)と呼ばれる。

定量限界 Limit of Quantitation (LOQ): 許容される精度で定量されることができ、試験試料中の分析成分の最少量又は濃度。定量限界はさまざまに定義されているが、MDLより大きな値でなければならない、全部が揃っている分析法に適用されることが望ましい。

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

限度試験 Limit Test: 分析成分が定義済みの懸念レベルを有する半定量スクリーニング法の一つ。バイナリ試験又はパス/フェイル試験とも呼ばれる。

直線性 Linearity: 一定の範囲内で、試験試料中の定量されるべき分析成分の量と比例した機器の応答又は試験結果を提供する分析法の能力。

マトリックス Matrix: 分析成分を除く試験試料のすべての成分。

マトリックスブランク Matrix Blank: マトリックス成分に関して分析される試料と密接に一致する物質。理想的には、マトリックスブランクは、目的の分析成分を含まないが、試験試料を分析するために用いるすべての試薬を含む、すべての試料処理操作に供される。マトリックスブランクは、分析に使用されるマトリックス、試薬及び装置に起因する著しい干渉がないことを判定するために用いる。

マトリックス効果 Matrix Effect: 分析成分濃度又は量の測定に対する試料マトリックス由来の1つ以上の成分の影響。マトリックス効果は、分析成分の単純な溶媒溶液により生成される応答と比較して、検出器応答の増加又は減少として観察できる。

マトリックスソース Matrix Source: 分析法妥当性評価に使用される試験マトリックスの起源。試料マトリックスは、その起源により多様性を有することがある。異なる食品マトリックス源は、異なる市販ブランド、異なる供給元からのマトリックス、又は場合によっては全く異なるマトリックスとして定義することができる。例えば、異なる物理化学的特性を有する様々な食品マトリックスが選択される場合、各食品試料マトリックスの供給源の数は1つ以上である可能性がある。

マトリックススパイク Matrix spike: 指定された量のマトリックスに既知量の分析成分を添加することによって調製された試料の一定分量。マトリックススパイクは、分析法が特定のマトリックス中の特定の分析成分の分析に適切かどうかを立証するために、全ての分析手順に供される。試験室添加マトリックスとも呼ばれる。

分析法ブランク Method blank: 目的の分析成分を含まないが、試験試料を分析するために使用されるすべての試薬を含む、すべての試料処理操作に供される物質。分析成分を含まない適切なマトリックスブランクがない場合には、試薬としての水の一定分量がしばしば分析法ブランクとして使用される。

分析法検出限界 Method Detection Limit (MDL): 確実にゼロと区別できる試験試料中の分析成分の最少量又は濃度。MDLは、感度、装置ノイズ、ブランクの変動、試料マトリックスの変動、及び希釈係数に依存する。

分析法開発 Method Development: 分析法の性能特性の設計、最適化及び予備評価のプロセス。

分析法妥当性評価 Method Validation: 分析法がその意図された目的に適していることを実証又は確認するプロセス。妥当性評価は、精確さ、精度、特異性、検出限界、定量限界、直線性、適用範囲、堅牢性及び頑健性などの性能特性を実証することを含む。

分析法検証試験 Method Verification: 試験室が許容可能なレベルで妥当性評価された分析法を再現できることを実証するプロセス。

最少検出可能濃度 Minimum Detectable Concentration (MDC): 定性分析において、測定された応答が検出閾値を超え、分析成分が試料中に存在することを正しく結論づけることができること

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

を、特定の高確率(通常 95%以上)で担保するために、試料中に存在しなければならない、分析成分の最低濃度の推定量。

精度 Precision: 特定の条件下で得られた独立した試験結果の間の一貫性。精度は、試験結果の標準偏差又は信頼限界のような統計的手法により記述される。偶然誤差の項も参照のこと。精度は、更に、繰り返し性(併行精度)、中間精度及び再現性(再現精度)に分類することができる。

定性分析法 Qualitative Analysis/Method: 物質をそれらの化学的、生物学的又は物理学的特性に基づいて、同定又は分類する分析法又は方法。試験結果は、問題の分析成分の存在又は不在のどちらかである。

定量分析法 Quantitative Analysis/Method: 許容可能な精確さ及び精度で、分析成分の量又は濃度が定量(又は推定)されて、適切な単位で数値として表す分析法又は方法。

偶然誤差 Random error: 反復測定において予測不可能なように変化する測定誤差の成分。精度の項も参照のこと。

適用範囲 Range: 分析法が適切な精確さ及び精度を提供する濃度の区間。

試薬ブランク Reagent Blank: 分析法全体を通じて取られた手順で使用される試薬。試薬ブランクは、分析に使用される試薬又は装置による著しい干渉がないことを判定するために用いる。

回収率 Recovery: 最終判定の時点において、測定サンプルの分析部分から残っている(実残留又は添加)分析成分の割合。回収率は、通常、百分率で表される。

参照物質 Reference material: 1つ以上の特定の性質に関して、十分に均質かつ安定な物質で、測定過程又は公称特性(nominal properties)の検査において意図された目的に適合していることが実証されている物質。

参照標準物質 Reference standard: 一般に、特定の組織の特定の場所で入手可能な、最も高い計量品質を有する標準物質であり、この標準物質から測定が行われるか又は導出される。
注: 一般に、これは、米国立標準技術研究所(NIST)などの標準物質作成機関により提供され、認定された国内又は国際的なトレーサブルな標準物質を指す。

繰り返し性(併行精度) Repeatability: 同じ試験施設内において、同じ作業者によって、同じ装置を使用して、短い時間間隔内で、同じ試験項目について同じ分析法を用いて、独立した試験結果が得られる観察条件下で得られた精度。

代表分析成分 Representative Analyte: 類似の物理的及び/又は化学的特性を有する他の分析成分に関して、推定される分析性能を評価するために使用される分析成分。1つの代表分析成分についての許容可能なデータは、代表分析成分群について性能が満足できることを示すとみなされる。代表分析成分は、それらについて最悪の性能が予想されるものを含めるべきである。代表分析成分は、主に非標的分析及び未知のスクリーニング法に使われる。

代表マトリックス Representative Matrix: 他のマトリックスに関して見込みがある分析性能を評価するため、又はマトリックスマッチ校正のために、広く類似する食品の分析において使用されるマトリックス。食品マトリックスの場合、類似性は、通常、水分、脂肪、タンパク質及び炭水化物の量に基づいている。試料の pH 及び塩分もまた、いくつかの分析成分に著しい影響を及ぼし得る。

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

再現性(再現精度) Reproducibility: 異なる試験施設において、異なる作業者によって、異なる装置を使用して、同じ試験項目について同じ分析法を用いて、独立した試験結果が得られる観察条件下で得られた精度。

堅牢性/頑健性 Ruggedness/Robustness: 分析法パラメータのわずかではあるが意図的な変動に対して影響を受けないでいる分析手順の能力の尺度で、通常の使用中のその信頼性の指標となる。

スクリーニング分析法 Screening Analysis/Method: 特定の濃度(対策レベル又は目標レベル)以上で試料中の分析成分を検出することを目的とした分析法。スクリーニング法は、分析時間の短縮とサンプル処理量の増加のために、一般的に、簡略化された分析法の使用を試みる。

選択性 Selectivity: 分析法が、混合物又はマトリックス中の特定の分析成分を、類似の挙動を示す他の成分からの干渉なしに測定できる程度。分析化学においては、特異性よりも選択性という用語の方が好ましい。

感度 Sensitivity: 測定された量(例:分析成分濃度)の変化に対応する機器応答の変化。感度は、一般に、応答曲線の勾配又は LOQ 付近の濃度における検量線の傾きとして定義される。

特異性 Specificity: 定量分析では、特異性は、存在することが期待される成分の存在下で、分析法が分析成分を測定する能力である。一般に、選択性という用語の方が特異性よりも好ましい。

添加回収率 Spike Recovery: 分析成分が指定された量のマトリックスに添加され、全分析手順に供された後の最終定量時点において残っている分析成分の割合。添加回収率は、通常、百分率で表される。添加回収率は、分析法のために記載されたように計算されることが望ましい。例えば、分析法が、重水素化内標準又はマトリックスマッチ校正標準を使用することを規定している場合、報告された分析成分回収率は、それらの手順に従って計算されるべきである。

標準 Standard: 同一性及び純度及び/又は濃度が既知の物質。

標準参照物質 Standard Reference Material (SRM): 米国立標準技術研究所(NIST)により交付された認証参照物質。(www.nist.gov/SRM)。

系統誤差 Systematic error: 反復測定において一定のままであるか又は変化が予測可能である測定誤差の成分。バイアスとも呼ばれる。

閾値 Threshold Value: 定性分析において、統計的に懸念レベルより低いか(限界試験の場合)、又は陽性の同定が終了する(同定の確認分析法の場合)分析成分の濃度。カットオフ濃度の項も参照のこと。

真度 Trueness: 一連の測定からの平均値と真値又は受け入れられた参照値との一致の程度。これは、系統誤差(バイアス)に関連している。

不確かさ Uncertainty: 測定値に起因する値の分散を特徴づける非負のパラメータ。

**FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)**

付録 2—特定の性能特性に関する許容基準の例 Examples of Acceptability Criteria for Certain Performance Characteristics

許容基準の例は、参考文献 7, 9, 10, 14 及び 18 にある。FVM プログラムでカバーされるすべての方法論に完全に適用できる単一の許容可能性のセットがあるというわけではない。しかしながら、多くの分析法のための良い出発点は、Codex Alimentarius Commission, Procedural Manual, Twenty-second ed., 2014[10]である。

A. 定量法許容基準 Quantitative Method Acceptability Criteria

表 A2.1. 分析濃度の桁の増加に対する評価基準
(参考文献 10、72 ページの表 4 及び参考文献 7 から一部複製)

ML* ユニット	0.001 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	1 g/kg	10 g/kg
代替 ML* ユニット	1 ppb	10 ppb	100 ppb	1 ppm	10 ppm	100 ppm	0.1%	1 %
ML 濃度比 (C _{ML})	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²
最少適用範囲	0.0006 ~ 0.0014 mg/kg	0.006 ~ 0.014 mg/kg	0.03 ~ 0.17 mg/kg	0.52 ~ 1.48 mg/kg	6.6 ~ 13.3 mg/kg	76 ~ 124 mg/kg	0.83 ~ 1.2 g/kg	8.8 ~ 11 g/kg
LOD (≤ mg/kg)	0.0002	0.002	0.01	0.1	1	10	100	1000
LOQ (≤ mg/kg)	0.0004	0.004	0.02	0.2	2	20	200	2000
RSD _r **	22%	22%	11%	8%	6%	4%	3%	2%
PRSD _R #	22%	22%	22%	16%	11%	8%	6%	4%
RSD _R ###	≤ 44%	≤ 44%	≤ 44%	≤ 32%	≤ 22%	≤ 16%	≤ 12%	≤ 8%
回収率	40%- 120%	60%- 115%	80%- 110%	80%- 110%	80%- 110%	90%- 107%	95%- 105%	97%- 103%

* ML は分析濃度であり、分析法の使用目的に応じて、最大濃度、最小濃度、標準濃度又は濃度範囲として、分析成分/試料マトリックスの組合せで定義することができる。

** RSD_r 又は繰り返し性は、短い期間内で条件ができるだけ一定に保たれる場合の結果の一致の程度(例: 単一の試験室により示された反復試験の相対標準偏差又は最善の精度)を言う。一般的に、RSD_rの許容値は、表中の値の 1/2 から 2 倍である(HorRat_r = RSD_r(測定値、%)/RSD_r(計算値、%))。濃度比が ≥10⁻⁷ の場合は Horwitz 理論が適用される。濃度比が < 10⁻⁷ 場合は Thompson 理論が適用される。

PRSD_R 又は予測相対再現性標準偏差(Predicted Relative Reproducibility Standard Deviation)は、Horwitz/Thompson 式に基づく。濃度比が < 10⁻⁷ 場合は Thompson 理論が適用される。

FDA FVM プログラムのための化学分析法の 妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

RSD_R 又は再現性(再現精度)は、操作条件ができるだけ異なる場合の結果の一致の程度(例:異なる試験室の同じ試験試料)を言い、Horwitz/Thompson 式から計算されるべきである。Horwitz/Thompson 式が適用できない場合(分析目的又は規制に従ったため)、もしくは分析法を基準に「変換する」場合は、適切な分析法性能試験から得られた RSD_R に基づくことが望ましい。測定値と予測値の比は、 ≤ 2 が望ましい(HorRat_R = RSD_R/PRSD_R ≤ 2)。

B. 定性法許容基準 Qualitative Method Acceptability Criteria

利用可能な定性分析法に対する許容可能な基準の例は非常に少ない。AOAC は、定性分析法の性能を特徴づける方法として、比較的新しい検出可能性 (Probability of Detection: POD) モデルを使用している[9]。

上記で論じたように、限度試験スクリーニング法は、一般に、特に懸念レベル又は報告レベルでの偽陰性を最小にすることが望ましい。仮陽性は、定量分析法又は確認分析法によって更に分析されるので、偽陽性の発生はあまり重要ではない。しかし、不必要な確認試験を避けるために、偽陽性率は、通常、10~15%未満が望ましい(14, 18)。

表 A2.2. 限度試験/スクリーニング分析法の一般的評価基準

偽陰性率	$\leq 5\%$ (懸念レベルにおいて ¹⁾)
偽陽性率	$\leq 10-15\%$

¹ 許容可能な偽陰性率は、分析法の使用目的に大きく依存する。

付録3—妥当性評価計画の例 Examples of Validation Plans

A. レベル1 妥当性評価における同一分析成分を有する他のマトリックスへの拡張 Extension to other matrices with the same analyte(s) at Level One Validation

この計画は、マトリックス Y 及び分析成分 Z についての緊急使用分析法拡張計画を示す。この計画は、2つの異なるマトリックスソースを利用している。代表的マトリックスが食品群全体を特徴づけるために使用される場合は、その群からの追加の異なる食品を「ソース」として使うことが推奨される。この計画は、緊急時使用のためにのみであることに注意されたい。最低でもレベル2 妥当性評価が実施されるまで、新規マトリックスを分析法の適用範囲に正式に含めることはできない。

表 A3.1. マトリックス拡張計画(レベル1 妥当性評価、例)

	マトリックス	試料 1 & 2	分析成分 Z 添加試料 3 & 4	分析成分 Z 添加試料 5 & 6	分析成分 Z 添加試料 7 & 8
1 日目	マトリックス Y (ソース 1)	ブランク	1/2X 添加 レベル	X 添加 レベル	2X 添加 レベル
1 日目	マトリックス Z (ソース 2)	ブランク	1/2X 添加 レベル	X 添加 レベル	2X 添加 レベル

注:

- i. マトリックス Y として示された試験部分マトリックスは、2つの異なる市販のブランドを代表する。
- ii. 添加レベル: 添加は、分析法に述べられているとおり、懸念レベル又は対策レベル(X)並びに1/2X 及び 2X に相当するレベルである。
- iii. 各マトリックスの添加は、同日中に行うことができる。
- iv. 表 1 に規定する要件を満たす他の添加計画を使用しても良い。

B. レベル2 妥当性評価における同一マトリックス内の類似の分析成分への拡張 Extension to similar analytes in the same matrix at Level Two Validation

妥当性評価された分析法は、同じ化学基に属する他の潜在的な分析成分に拡張することができる。例えば、毒素分析法は他の毒素に拡張することができる。本来は、どうもろこし中の分析成分 A について妥当性評価された分析法について、その分析法を3つの異なるソースからの缶詰どうもろこし中の新規分析成分 Y 及び Z に拡張するための、一連の妥当性評価試験の構成例を下表に示す。

表 A3.2. 類似分析成分に対する拡張計画(レベル2 妥当性評価、例)

	マトリックス	分析成分 Y 添加レベル	分析成分 Z 添加レベル
1 日目	どうもろこし 1,2,3	0, 1/2X, X, 2X	0, 1/2X, X, 2X
2 日目	どうもろこし 1,2,3	0, 1/2X, X, 2X	0, 1/2X, X, 2X
3 日目	どうもろこし 1,2,3	0, 1/2X, X, 2X	0, 1/2X, X, 2X

**FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)**

注:

- i. 同じ製品の3つの異なる市販ブランドが分析される。
- ii. 添加レベル: 添加は、分析法に示されている懸念レベル又は対策レベル(X)並びにそれに対応する1/2X及び2Xに相当するレベルである。
- iii. 各分析成分は、ブランクマトリックス並びに1/2X、X及び2X添加レベルで分析される。
- iv. 保証がある場合は、分析成分の同時分析を行ってもよい。
- v. 表1で規定された要件を満たす他の添加計画を使用しても良い。

C. 単一マトリックス及び単一分析成分に関するレベル2妥当性評価 Validation at Level Two for single matrix and single analyte

この計画では、単一マトリックスの3つの異なる市販ブランドを使用する。単一マトリックスが単一の分析成分に対して妥当性評価されている。

**表 A3.3. 単一マトリックス及び単一分析成分レベル2妥当性評価に関する計画(例)
Plan for Single Matrix and Single Analyte Level Two Validation (Example)**

	マトリックス1 ソース1	マトリックス1 ソース2	マトリックス1 ソース3
1日目	ブランク 添加(X)	添加(X) 添加(2X)	ブランク 添加(1/2X)
2日目	添加(2X) 添加(1/2X)	ブランク 添加(1/2X)	ブランク 添加(2X)
3日目	添加(1/2X) 添加(X)	添加(2X) ブランク	添加(X) 添加(X)
4日目	添加(2X) ブランク	添加(X) 添加(1/2X)	添加(2X) 添加(1/2X)

注:

- i. 試料マトリックスは、3つの異なるマトリックスソースから、1つのマトリックスを代表する。
- ii. 添加レベル: 添加は、分析法に示されている懸念又は対策レベル(X)並びにそれに対応する1/2X及び2Xに相当するレベルである。
- iii. 実験の間に、3つの異なるマトリックスソースはそれぞれ8回分析され(繰り返し分析)、無添加2回、各添加レベル2回ずつである。
- iv. 妥当性評価は、4日間にわたって行われる。
- v. 表1で規定された要件を満たす他の添加計画を使用しても良い。

**FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)**

付録 4—代表マトリックスの選択 Selection of Representative Matrices

幅広い範囲の製品に適用できるようにすることを目的とした分析法のための妥当性評価プロトコルを設計する際の代表的なマトリックス及び CRM の選択を支援することができる 2 つのツールを以下に示す。食品組成は様々であり、多種多様な食品を対象とした分析法の妥当性評価は、利用可能な資源と様々な食品の種類による十分な妥当性評価とのバランスをとることを非常に困難にしている。

A. 食品グループ及び代表食品 Commodity groups and representative commodities

表 A4.1. 野菜及び果物、穀類及び動物起源の食品(参考文献 14 から一部複製)

食品グループ	一般的な食品カテゴリー	一般的な代表食品
1. 高含水率	仁果類	りんご、西洋なし
	核果	あんず、おうとう、もも
	その他の果実	バナナ
	ネギ類	たまねぎ、にら
	果菜/ウリ科植物	トマト、ピーマン、きゅうり、メロン
	あぶらな科野菜	カリフラワー、芽キャベツ、キャベツ、ブロッコリー
	葉菜及びフレッシュハーブ	レタス、ほうれんそう、バジル
	茎野菜	セロリ、アスパラガス
	飼料/飼料作物	新鮮なアルファルファ、飼料用ソラマメ類、新鮮なてんさい
	新鮮なマメ科野菜	新鮮なさやえんどう(さや付き)、えんどう、未成熟えんどう、そら豆、べにばないんげん、さやいんげん
	根菜及び塊茎野菜の葉	てんさい及び飼料用ビートの先端
	新鮮な菌類	シャンピニオン、アンズタケ(カンテラーレ)
	根菜及び塊茎野菜又は飼料	てんさい及び飼料用ビートの根、にんじん、ばれいしょ、かんしょ
2. 高酸含有及び高含水率	かんきつ類	レモン、マンダリン、タンゼリン、オレンジ
	小果樹類及びベリー類	いちご、ブルーベリー、ラズベリー、黒フサスグリ、赤フサスグリ、白フサスグリ、ぶどう
	その他	キウイフルーツ、パイナップル、ルバーブ(食用ダイオウ)

FDA FVM プログラムのための化学分析法の
妥当性評価に関するガイドライン(第2版)

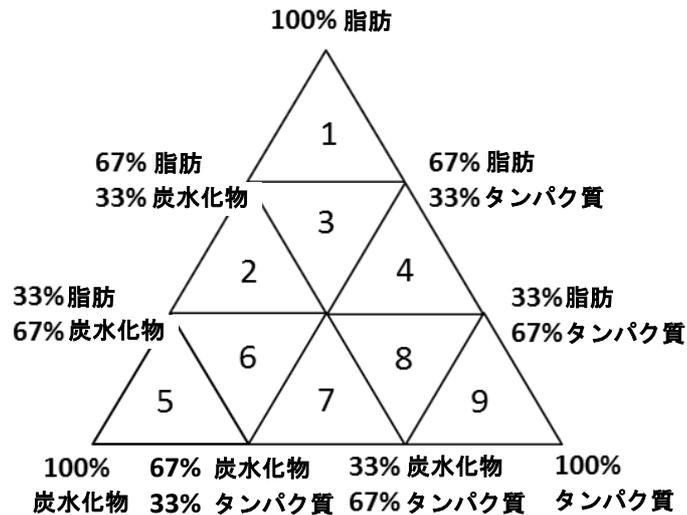
表 A4.1. 野菜及び果物、穀類及び動物起源の食品(続き)

食品グループ	一般的な食品カテゴリー	一般的な代表食品
3. 高糖分及び低含水率	はちみつ、乾燥果実	はちみつ、干しぶどう、乾燥アンズ、乾燥プラム、果実ジャム
4a. 高油含量及び超低含水率	木の実	くるみ、ヘーゼルナッツ
	油糧種子	あぶらなの種子、ひまわりの種子、綿実、大豆、らっかせい、ごまの種子など
	木の実及び油糧種子のペースト	ピーナッツバター、タヒニ(ごまペースト)、ヘーゼルナッツペースト
	木の実、油糧種子及び油糧果実からの油	オリーブ油、なたね油、ひまわり油、かぼちゃ種子油
4b. 高油含量及び中程度含水率	油糧果実及び製品	オリーブ、アボカド及びそのペースト
5. 高デンプン及び/又はタンパク含量、及び低含水率及び低脂肪含量	乾燥豆科野菜/豆類	そら豆、乾燥そら豆、乾燥いんげん豆(黄色、白色、茶色、斑入り)、レンズ豆
	穀類及びその製品	小麦、ライ麦、大麦及びオート麦粒、とうもろこし、米、全粒パン、白パン、クラッカー、朝食用シリアル、パスタ
6. 難しい又は独特な食品		ホップ、カカオ豆及びその製品、コーヒー、茶、スパイス
7. 肉(筋肉)及び魚介類	赤色肉	牛肉、豚肉、子羊肉、猟獣肉、馬肉
	白色肉	鶏肉、鴨肉、七面鳥
	内臓	肝臓、腎臓
	魚	タラ、コダラ、サケ、マス
	甲殻類	エビ、ホタテ貝、カニ
8. 乳及び乳製品	乳	牛、山羊及び水牛の乳
	チーズ	牛及び山羊のチーズ
	乳製品	ヨーグルト、クリーム
9. 卵	卵	鶏、鴨、ウズラ及びガチョウの卵
10. 動物起源の食品からの脂肪	肉からの脂肪	腎臓脂肪、ラード
	乳脂肪	バター
	魚油	タラ肝油

B. AOAC 食品マトリックストライアングル AOAC Food Matrix Triangle

AOAC 食品マトリックストライアングル(図 A4. 1)は、相対的な脂肪、タンパク質及び炭水化物含量に基づいて、食品及び食品マトリックス参照物質を、9つの領域に分類するために使用することができる[9、19、20]。このツールは、多種多様な食品マトリックスを対象とした分析法の妥当性評価や、より限定された適用性を意図した分析法のための類似の食品マトリックスの分類を助けるのに有用である。

図 A4.1. タンパク質、脂肪及び炭水化物含量に基づいて領域に仕切られた食品



資料②: Veterinary Manual of Requirements and
Guidelines - Vet MORAG
Part 5A - Residues

動物用医薬品申請に関する要求事項及びガイドライン

パート 5A - 残留

本文書の原文は、オーストラリア政府農薬・動物用医薬品局により、下記のタイトルで英語で公表されたものである。

Veterinary Manual of Requirements and Guidelines - Vet MORAG
Part 5A - Residues

https://archive.apvma.gov.au/morag_vet/vol_3/part_05a_residues.php

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に応じ原文を参照ください。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます



パート 5A – 残留

1. 緒言
 - 1.1. 参考資料
2. 申請の種類
 - 2.1. モジュールカテゴリー
 - 2.2. 固定カテゴリー
3. 薬物動態及び残留評価の原則
 - 薬物動態試験
 - 健康基準 (ADI)
 - 食事由来暴露評価
 - 休薬期間の推定
4. 一般的な指示
 - 4.1. OECD 優良試験所基準 (GLP) の原則
 - 4.2. 残留ガイドライン
 - 4.3. 薬物動態試験、残留動態試験及び指標残留減衰試験に関する一般的な指示
 - 4.3.1. 薬物動態データ
 - 4.3.2. 残留動態データ
 - 4.3.3. 指標残留減衰試験
 - 4.4. 申請様式
5. 残留データ要求事項
 - 5.1. 要求データの性質
 - 5.2. 薬物動態及び残留動態データ (最大残留基準値 [MRL] 決定)
 - 5.2.1. 概要
 - 5.2.2. 特定要求事項
 - 5.3. 指標残留減衰試験データ (休薬期間 [WHP] 推定)
 - 5.3.1. 特定要求事項
 - 5.4. 分析法
6. 用語
7. 参考文献及び補足資料
 - 注釈
 - 改訂履歴

1. 緒言 INTRODUCTION

農薬及び動物用医薬品法(1994年)(*The Agricultural and Veterinary Chemicals Code Act 1994*)では、オーストラリア農薬・動物用医薬品局(APVMA: Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority)は、有効成分又は化学製品を投与された動物に由来する食品中に、消費者に健康被害が及ぶと考えられる有効成分や化学物質、又はその代謝物の残留物が含まれてはならないという基準を担保しなくてはならない、と規定している。

本文書の目的は、動物由来食品中の動物用医薬品の最大残留基準値(Maximum Residue Limits: MRL)及び休薬期間(Withholding Periods: WHP)の設定に用いられるデータを含む、動物用医薬品の登録に際して、薬物動態及び残留データの要求事項を概説することである。データの要求事項には、MRL及びWHP設定過程の一部には、食事由来暴露評価が含まれる。

本文書においては、最大残留基準値(MRL)を次のように定義する。

「動物用医薬品を登録された方法で使用した結果生じる最大の残留濃度で、ヒトの動物由来食品中又は食品接触面の許容量として法的に許可又は容認されるとみなされる値。その濃度は、mg/kg食品重量(液体食品の場合はmg/L)で表される。」

この定義は、FAO/WHOコーデックス食品残留動物用医薬品委員会(FAO/WHO Codex Alimentarius Committee for Residues of Veterinary Drugs in Foods)及び欧州動物用医薬品委員会(European Committee for Medicinal Products for Veterinary Use: CVMP)によって採用された定義と合致することに留意すべきである。事実、オーストラリアにおける残留動物用医薬品のMRL設定に適用される原則は、FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: JECFA)が用いる原則と合致している。

動物用医薬品の登録申請の補足資料として提出される薬物動態及び残留データは、APVMA化学物質及び残留プログラム(APVMA Chemistry and Residues Program)により評価される。必要に応じて、その他の政府機関及び国際的に認知された機関により出された勧告などの情報を考慮する。評価は、ピア・レビューの対象となる。以下の場合にパブリックコメントが求められる。

- i. 新規の有効成分を含有する動物用医薬品について、はじめて登録を検討するとき
- ii. APVMAによる承認済みの有効成分を含有する動物用医薬品について、はじめて食料生産動物種への使用を検討するとき
- iii. APVMAによる承認済みの有効成分を含有する動物用医薬品について、新規の食料生産動物種への使用を検討するとき
- iv. APVMAによる承認済みの有効成分を含有する動物用医薬品について、新規の投与経路又は変更された投与計画を用いて食料生産動物種への使用を検討するとき

MRLについての最終勧告及び関連する勧告は、オーストラリア農薬・動物用医薬品官報(*Australia Agricultural and Veterinary Chemicals Gazette*: APVMA 官報)で公表されている。

APVMAのMRL勧告は、オーストラリア・ニュージーランド食品基準局(Food Standards Australia New Zealand: FSANZ)により食品基準法(*Food Standards Code*)のパート14:「汚染物質及び残留」への掲載、及びこれに続くオーストラリア州・準州食品法(Australian State and Territory food legislation)への掲載が検討される。申請者は、薬品の使用方法の変更や新たなデータの取得などをきっかけに、MRLが再検討される場合があることに留意すべきである。

食品及び主要な飼料中の農薬及び動物用医薬品、並びに関連物質のMRLは、APVMAのMRL基準「食品及び飼料中の最大残留基準値(MRL Standard: Maximum Residue Limits in Food and Animal Feedstuffs)」にも記載される。この文書には、食品中の農薬及び動物用医薬品並びに関連物質のMRLの一覧(表1)、MRLが適用される食品の部分(表2)、残留の定義及び指標残留(表3)、動物用飼料中の農薬のMRL(表4)及びMRLを必要としない物質の使用(表5)が掲載されている。APVMAはMRL基準の変更をAPVMA官報において1ヵ月単位で公表している。

1.1. 参考資料 Reference materials

これらの要求事項及びガイドラインで引用した文書(法及び基準を含む)の書誌の詳細については、「参考文献及び補足資料」の項に記載する。申請者は、これらの文書の多くが定期的に更新されていることに注意することが望ましい。従って、参照資料の最新版を確実に入手することが重要である。

2. 申請の種類 TYPES OF APPLICATIONS

申請に必要な薬物動態及び残留データの要素 (elements) は、申請の種類により異なる。パート 5A (薬物動態及び残留) のどのデータモジュールが必要かは、申請の種類により決定する。各モジュールは多数のデータ要素を要求している。データ要素の詳細については、本文書のセクション 5.1 に記載されている。

2.1. モジュールカテゴリー Modular categories

パート 5A には、5 つのモジュールがある。各モジュールは、それぞれ異なる種類の申請に対応している。各種申請に関連したモジュールは、Volume 3 の「モジュールカテゴリーのモジュールレベル (Module levels for modular categories)」で確認することができる。

モジュール 5.1、5.2 及び 5.4 は動物用医薬品の登録のための薬物動態及び残留データ要求に関連し、モジュール 5.3 及び 5.5 は許可申請に伴う残留評価に関連する。モジュールの詳細は、Volume 3 の「モジュールカテゴリーのモジュールレベル」及び Volume 2 の「カテゴリー要求事項及びガイドライン (Category requirements and guidelines)」の個々のカテゴリーの章でも詳述されている。

包括的評価 Comprehensive assessment (モジュール 5.1) は、Volume 3 の「モジュールカテゴリーのモジュールレベル」において、「申請の種類 (Type of application)」の欄の製品の種類又は申請の種類に対応する「要求データ (Data Required)」の欄に記載されるすべてのデータ要素を含む完全な薬物動態及び残留データパッケージの提出を要求している。

縮小評価 Reduced assessment (モジュール 5.2) 及び **限定評価 Limited assessment (モジュール 5.4)** は、**包括的評価 (モジュール 5.1)** に含まれるデータ要素のサブセットを構成している。

2.2. 固定カテゴリー Fixed categories

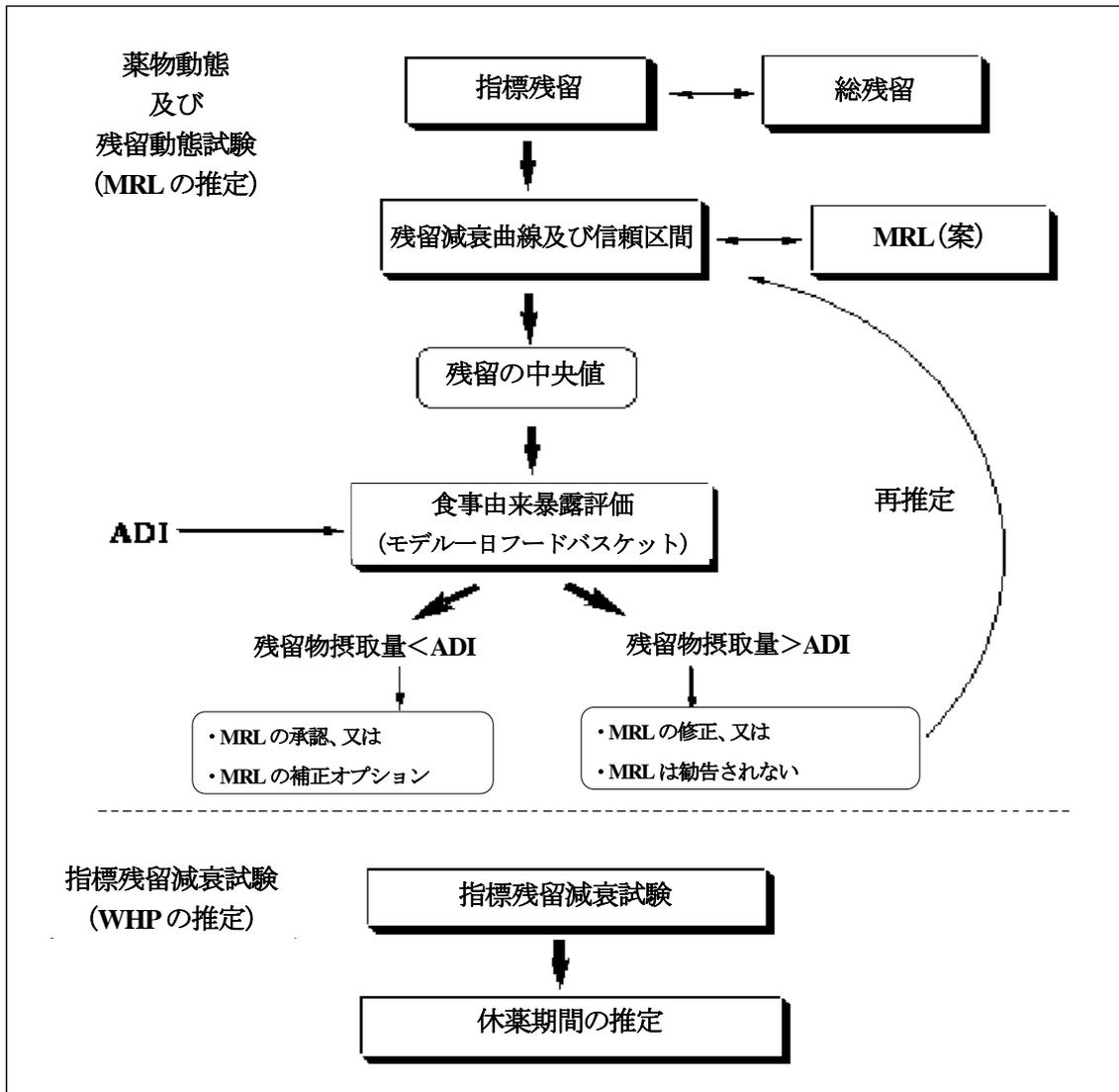
固定カテゴリー (例: カテゴリー 1) で評価される申請は、薬物動態及び残留データの提出を要求される場合がある。データのレベルは、申請カテゴリーに基づくモジュール 5.1、5.2 又は 5.4 に対応し、Volume 2 の「カテゴリー要求事項及びガイドライン」の関連するカテゴリーの章に記載されている。

3. 薬物動態及び残留評価の原則

APVMA は、農薬及び動物用医薬品の両方の登録に責任を有し、安全性評価の一環として残留物の摂取量を評価するためにハーモナイズされた手法を用いている。先進的な規制制度を導入しているほとんどの国では、農薬及び動物用医薬品の登録は異なる政府機関によって行われており、国際的には、摂取量を評価するための 2 つの異なるが保守的なアプローチが発展している。諸外国と整合性のある動物用医薬品の MRL 決定の結果を得るために、APVMA は、JECFA が MRL の推定に使用する手順を用いているが、食品の安全性評価のための残留物の摂取量推定には、内部的にハーモナイズされた手法を保持している。

動物用医薬品の薬物動態及び残留データを評価するために APVMA が用いるアプローチの概要を図 1 に示す。

図 1: APVMA による薬物動態及び残留データの評価アプローチの概要



薬物動態試験 Pharmacokinetic studies

対象動物種で実施された薬物動態試験では、投与動物由来の可食組織及び食品中の残留物の化学的特性及び濃度に関する情報が得られる。これらのデータは、各食品について適切な**指標残留**を選定し、投与後の様々な時点における各食品中に存在する**指標残留**及び**総残留**との関係(比)を規定するために用いられる。対象動物における動物用医薬品の残留減衰パターン、及び肝臓又は腎臓などの特定の臓器に残留が持続する可能性を考慮する。標準的な可食組織の残留データについて回帰分析を行う。各組織について、95パーセンタイルの残留濃度の95%上限信頼限界に基づき統計学的許容限界を推定する。標準組織の最大許容残留濃度の決定(MRL案)は、推定一日摂取量¹(Estimated Daily Intake : EDI)を用いた1日の食事由来暴露濃度の計算を含む繰り返し作業である。EDIは、残留濃度の**中央値**(MRLではなく)及び1日の標準的な食事に基づき算出され、その後健康基準(ADI)と照合される。

健康基準 Health standard (ADI)

毒性学的評価の一部として、最も感受性の高い適切な試験動物種において、最も感受性の高いパラメータに関して、無作用(毒性)量(NO(A)EL)が決定される。NO(A)ELに安全係数を適用して一日摂取許容量(ADI)を求める。安全係数は、動物の毒性データをヒトに外挿する際に伴う不確かさ、及びヒト集団内の個体間の変動を考慮したものである。通常、ヒトは試験動物よりも10倍感受性が高く、ヒト集団内の感受性には10倍の開きがあると仮定することにより、ADIは一般にNOE(A)Lよりも100倍小さい値となるが、大幅に変化する可能性がある。

食事由来暴露評価 Dietary exposure assessment

動物用医薬品の提案された用途を条件として、APVMA は、平均的なヒト(体重 60 kg)の標準的な 1 日の食事には哺乳動物の筋肉又は鶏肉及び内蔵 500 g(又は魚 300 g)、乳 1.5 L、卵又は卵製品 100 g、はちみつ 20 g を含むとみなしている。これらの摂取量は、JECFA 及び他の国際的規制機関が用いる摂取量と一致している。

MRL の決定 Determination of MRLs: 各組織の総残留に対する指標残留の比は、1 日のフードバスケット中の残留物の総量の計算(EDI によって反映される)に使用され、MRL 案が勧告された場合に、EDI が ADI を超えないことを検証するために使用される。EDI が ADI を超える場合、MRL 案は勧告されず、(より低い)MRL 案を用いてさらに評価を繰り返す。

MRL 勧告前に、動物用医薬品の適正使用規範(Good Practice in the Use of Veterinary Drugs: GPVD)に従い、動物用医薬品を使用後に食品に残ることが予想される残留濃度、及び日常モニタリングでの使用に適する分析検出法の利用可能性についても考慮する。これらの要因を考慮した後、得られた MRL は、最大許容残留濃度(許容食事暴露より推定)より低いことはあっても決してこれを超えることはない。

場合によっては、動物用医薬品の MRL の設定は必ずしも必要とされない場合がある。このような場合の動物用医薬品及びその使用パターンは MRL 基準の表 5 に含まれている。

休薬期間の推定 Estimation of withholding periods

MRL が割り当てられたら、次のステップは休薬期間(withholding periods : WHP)を設定することである。WHP は、動物に動物用医薬品が最後に投与されてからヒトが摂取する生産源となるまでに必要な最短期間である。WHP を遵守することにより、食品中の残留物が MRL を超えないことを担保する。WHP の長さは、検討対象の個々の製剤に依存する。従って、市販の製剤を用いた残留減衰試験で得られたデータに基づき、個々の動物用医薬品に特定の WHP が設定される。

4. 一般的な指示

4.1. OECD 優良試験所基準(GLP)の原則

OECD 優良試験所基準(Good Laboratory Practice: GLP)の原則に従って実施される残留試験に関する要求事項が、2003 年 1 月 1 日付で APVMA によって導入された。これは、オーストラリアで実施され、動物由来食品の MRL 設定の裏付けとなる残留試験は、圃場試験及び試験室試験の両方とも GLP に準拠していなければならないことを意味する。

オーストラリアで GLP に準拠する残留試験を実施する申請者は、OECD のウェブサイト <http://www.oecd.org/ehs/> で入手できるガイダンス文書「No.1: OECD 優良試験所基準原則」を参照すること。

オーストラリアで実施される試験が GLP 準拠となるためには、GLP 認定試験施設で試験を実施しなければならない。OECD GLP の原則の遵守を監視する責任がある唯一のオーストラリアの機関は、国立試験認可者協会(National Association of Testing Authorities: NATA)である。オーストラリアでの GLP 認定に関する詳細は、NATA のウェブサイト www.nata.asn.au で入手可能である。海外試験は、該当国の GLP 遵守モニタリングプログラム下にある GLP 認定試験施設で実施されなくてはならない。

申請者は、下記の場合に試験が GLP 要求事項の適用外であることに留意すべきである。

- i. 暫定的要求: 2003 年 1 月 1 日以降に APVMA に提出された申請は、試験が 2003 年 1 月 1 日より前にオーストラリアで開始された非 GLP 準拠試験が含まれている可能性がある。同様に、非 GLP 準拠の海外試験についても、試験が 2003 年 1 月 1 日より前に開始され、試験が開始された時点で海外の基準に従って実施されている場合には APVMA により受け入れられる。(注: OECD GLP の原則に従って行われていない試験は、薬剤の登録申請の補足として提出できる。しかし、「重要な」残留試験では GLP 準拠が義務付けられている。)

- ii. GLP 試験で使用する試験品 (有効成分又は製剤) の特性評価は、OECD GLP の原則に従って実施する必要があるが、NATA 又は NATA 相互承認パートナーによって ISO/IEC 17025 で認証された試験室を使用することが望ましい。これに関し、一部の EU 加盟国では試験品目の特徴づけに GLP 準拠を要求する場合がある。残留データを APVMA とこれらの加盟国の両方に提出予定の申請者は、試験品目の特徴づけに加盟国によって適用される基準に従うことを望む場合がある。
- iii. GLP の要求事項は、臨床的・生物学的同等性又は薬物動態学的試験、あるいは繊維中の残留物に関する試験には適用されない。
- iv. GLP の要求事項は、「許可 (Permits)」や「マイナー使用 (Minor Use)」の承認には義務付けられていないが、強く推奨されている。

4.2. 残留ガイドライン

APVMA は、先端産業団体と協力して、規定の残留の要求事項を取り扱う一連の残留ガイドラインを作成した。本ガイドラインは、最初に APVMA 官報に公表される。これらのガイドラインの一部は、本書の関係するセクションの説明で引用されている。特定の残留物の事項を取り扱うこれらのガイドライン及びその他のガイドラインは、APVMA のウェブサイトですべて入手可能である。関連する場合は、ガイドラインを参考にし、これに従うべきである。

4.3. 薬物動態試験、残留動態試験及び指標残留減衰試験に関する一般的な説明

新規の動物用医薬品が食料生産動物に使用される場合、申請者は、登録申請の補足資料として適切な薬物動態データ、残留動態データ及び残留減衰データ、又は関連する科学的根拠²の提出が求められる。基本的に、薬物動態データ及び残留データは、MRL の決定に使用され、残留減衰データは WHP の設定に用いられる。

4.3.1. 薬物動態データ

薬物動態データは、経時的な動物用医薬品の吸収 (A)、組織中の分布 (D)、代謝 (M) 又は生体内変換及び排泄 (E) からなる。留意すべきは、薬物動態試験の目的は、物質収支 (即ち、投与用量の定量的回収を達成すること) の 1 つではなく、むしろ**対象動物種**における動物用医薬品及びその代謝物の濃度-時間プロファイルに関する情報、及びその後の残留減衰試験を計画するための情報を得ることである。

さらに、対象動物種における動物用医薬品及びその代謝物の薬物動態プロファイルを、健康基準を設定するために用いられた実験動物種のプロファイルと定性的に比較し、毒性学的影響及び NOE(A) L との関連性を検証することにより食事由来暴露評価の妥当性を確認する。

$\text{薬物動態 (PK)} = \frac{\text{吸収 (A)} \cdot \text{分布 (D)} \cdot \text{代謝 (M)} \cdot \text{排泄 (E)}}{\text{時間 (t)}}$
$\text{生体内分布} = \frac{\text{D} \cdot \text{M} \cdot \text{E}}{\text{t}}$
$\text{消 失} = \frac{\text{M} \cdot \text{E}}{\text{t}}$

吸収 Absorption

吸収試験の主な目的は、吸収の**速度と量**に関連する動物用医薬品のバイオアベイラビリティ (生物利用率) を評価することである。吸収については投与経路に関係なく同一の検討事項が適用される。

体内吸収が無視できるものであること (即ち、代謝試験において、可食部中の総残留放射能濃度が、モニタリング及び監視目的に用いられる分析法の定量限界 (LOQ) 以下) が証明されている動物用医薬品の場合、さらなる残留試験を行う必要はない。しかし、顕著な体内吸収があり、いずれかの可食部中の総残留放射性物質が分析法の LOQ を超える場合は、完全な残留試験が要求される。

分布 Distribution

吸収後、動物用医薬品は、対象動物種の様々な組織や器官に分布する。分布試験の結果は、標的組織を明らかにするのに有用である。

代謝 Metabolism

異なる生体内変換生成物は、異なる毒性を持つ可能性がある。従って、全残留物の化学的性質、濃度及び持続性に関する情報が要求される。対象動物種における代謝試験の目的は、可食組織中の動物用医薬品の代謝運命について必要な情報を得るとともに指標残留を設定することである。

これらの試験は、対象動物で検出された代謝物が毒性試験に用いられた実験動物で検出されたものと同じであるかどうかを確かめるためにも必要である。これは、比較代謝と呼ばれ、薬剤を投与した動物の組織を摂取したときに、ヒトが暴露する代謝物が、健康基準の設定に用いられた実験動物でも生成されるかどうかを判断する。この情報は、食事由来暴露及びヒトの健康に対する潜在的リスクを評価する手法の妥当性を確認するのに必要である。

対象種、試験種 (in vitro 試験系を含む) 及び入手可能であればヒトへの使用によるデータから、全ての利用可能なデータを考慮することが望ましい。これらの試験によって、製品の代謝の適切な評価に必要な以下の情報を提供することが望ましい。

- 代謝物の性質
- 可食組織中(筋肉、肝臓、腎臓、脂肪)及び動物生産物(乳、卵及びはちみつ)中の残留物の化学的性質
- 代謝プロファイルに対する投与経路の影響
- 可能であれば、構造と生物学的活性との関係
- 結合代謝物のバイオアベイラビリティ

排泄 Excretion

対象動物種における、腎臓排泄及び糞便排泄を含む、排泄に関するデータが要求される。必要に応じて、その他のすべての排泄経路(例: 乳)を考慮することが望ましい。排泄経路に関する情報は、動物用医薬品が代謝される経路を反映する。

4.3.2. 残留動態データ:

残留動態試験は、可食組織中の**総残留**の経時的な濃度プロファイル、及びこれに対応する**指標残留**の濃度プロファイルに関する情報を提供している。これらデータは以下の目的で使用される。

- 投与後の任意の時点における可食食品中の指標残留と総残留との間の関係を定義する。
- 許容残留レベル(MRL)を算出する。

4.3.3. 指標残留減衰試験:

指標残留減衰試験のデータは、投与動物由来の可食組織(筋肉、肝臓、腎臓、脂肪、注射部位組織)中及び食品(乳、卵、はちみつ)中に経時的に動物用医薬品の指標残留が生成するかどうか、生成するならばその濃度について示すべきである。指標残留減衰試験の目的は、動物用医薬品の適切な休薬期間(WHP)を設定することである。

休薬期間 Withholding Periods (WHP)

指標残留減衰試験は、必要な WHP を確信をもって勧告できるに足る十分な減衰プロファイルを特徴づけるものでなければならない。ゼロ WHP が提案される場合、残留データによって投与後のいかなる時点でも関連する MRL を遵守していることが示されるべきである。データが不十分な場合、APVMA に対しデータを外挿するように求めたり、過度に信頼するよう要求してはならない。従って、指標残留減衰試験は、観察された変化について考えられるすべての原因を網羅するに足る十分な規模で行われるべきである。

輸出向けと畜保留期間 *Export Slaughter Intervals (ESI)* :

該当する場合、適切に設計された残留減衰試験で得られたデータは、製品の輸出向けと畜保留期間 (*Export Slaughter Interval: ESI*) の設定にも用いられる可能性が高い。ESI の設定には、MRL 又は定量限界 (LOQ) 以下の濃度まで残留減衰プロファイルをモニターすることが必要となる場合がある。本件に関する詳細は、パート 5B「動物用医薬品の要求事項シリーズの食品中の残留に関する海外貿易における問題」に示されている。

限界投与パターン *Critical use-pattern*

残留減衰試験は、オーストラリアで市販される剤型を用いて実施しなければならない。動物用医薬品のラベル原案に記載された限界投与パターンに従って動物に投与しなくてはならない。限界投与パターンとは、動物が暴露する可能性のある最大用量比をいう。一般的に、動物用医薬品の使用説明書では、用量比を体重範囲に対する比として表している。つまり、体重範囲の下限にある動物は、標準用量比を超える割合で投薬される可能性がある。体重 1 kg あたりの動物用医薬品の mg に関して、最大比が限界用量比と見なされる。

投与計画 *Treatment regimens*

投与計画は、大きく次のように分類される。

- 単回投与： 特定の治療効果を得るために動物用医薬品を動物に 1 回投与すること。この場合、動物用医薬品製剤の (限界用量比での) 単回投与は、残留試験における適切な暴露計画である。
- 反復投与： 内部/外部寄生虫駆除薬投与のような、単回投与を繰り返すこと。たとえ製品ラベルに明記されていなくても、反復投与計画が実際に合理的に予想される場合は、反復投与を評価すべきである。
- 短期投与： 数日間、1 回又はそれ以上、動物に投与すること。この場合、試験動物には、提案されたラベルで許容された最大期間投与されるべきである。再投与までの間隔が短い場合、又は動物用医薬品が可食組織中に残存する傾向にある場合、残留試験には、提案される最短の再投与間隔で複数回の投与期間を組み入れる必要があると思われる。
- 長期投与： 動物が長期間投与される場合 (例: 薬剤を添加した飼料又は水による投与) は、(しばしば) 休薬期間ゼロが望まれる。この場合、可食食品中の残留物濃度が定常平衡状態に達する (即ち、残留物濃度がプラトーに達したことを示す) のに十分な期間、提案された最大比で動物に投与しなくてはならない。

4.4. 申請様式

動物用医薬品の申請に関するパート 5A (薬物動態及び残留) のデータ要求のチェックリストを、申請方法の簡単な説明とともに以下の表 1 に示す。

表 1: パート 5A のデータ要求

要求項目	コメント
薬物動態及び残留動態試験 (MRL 決定のため) <ul style="list-style-type: none">● 試験の要約● ADI (案)● 指標残留 (案)● 標的組織 (案)● 投与後の特定の時点における総残留に対する指標残留比● 食品についての MRL (案)	<p>提案された指標残留及び標的組織、及び各食品の MRL 案の理由を明確に概説し、結果の解釈とともに、すべての薬物動態及び残留動態試験の要約の提出が要求される。付録に各試験についての完全なコピーを添付すること。</p> <p>MRL がすでに設定されている場合、以前に設定された指標残留、標的組織、総残留に対する指標残留比、MRL の詳細を提出すること。</p>

指標残留減衰試験(WHP 設定のため) <ul style="list-style-type: none"> 試験の要約 WHP(案) 	WHP を提案するに至った結果の解釈とともに、すべての関連する残留減衰データをまとめた要約の提出が要求される。付録に各残留減衰試験についての完全なコピーを添付すること。
分析法 <ul style="list-style-type: none"> 薬物動態及び残留動態試験に使用された分析法及び妥当性評価データの要約 指標残留減衰試験に使用された分析法及び妥当性評価データの要約 	付録に妥当性評価報告書を含む各分析法についての完全な報告書のコピーを添付すること。
付録 <ul style="list-style-type: none"> 薬物動態、残留動態及び残留試験に関する完全な報告書のコピーを、分析法及び妥当性評価の完全な詳細とともに添付すること。 	

5. 残留データ要求事項

5.1. 要求データの性質

動物用医薬品製剤を登録申請するための補足資料として提供すべき、薬物動態、残留動態及び指標残留減衰試験のタイプは、以下の条件に依存する。

- 動物用医薬品がすでに APVMA によって承認されているかどうか。
- APVMA による承認済みの動物用医薬品が、対象動物種へ使用するための製剤がすでに登録されているかどうか。
- 動物用医薬品の剤型、投与計画及び投与経路が、APVMA によってすでに検討されているかどうか。

申請において残留動物用医薬品への対応に関し要求されるデータの種類の詳細を、本文書の該当セクションとともに以下の表 2 に示す。

表 2: 製剤申請のタイプ別薬物動態及び残留データ要求事項

動物用医薬品	登録状況 対象動物種における 動物用医薬品の使用	剤型、投与経路 及び投与計画	データ要求事項 (参照セクション)
新規動物用医薬品 (現在、APVMA によって承認されていない)	--	--	薬物動態、残留動態及び残留減衰のフルパッケージ (セクション 5.2, 5.3, 5.4)
既存の動物用医薬品 (過去に APVMA によって承認されている)	現在未登録	--	薬物動態、残留動態及び残留減衰のフルパッケージ (セクション 5.2, 5.3, 5.4)

既存の動物用医薬品 (過去に APVMA によって承認されている)	現在、APVMA によって登録されている	現在未登録	薬物動態†、残留動態及び残留減衰のフルパッケージ (セクション 5.2†, 5.3, 5.4)
既存の動物用医薬品 (過去に APVMA によって承認されている。 ジェネリック登録)	現在、APVMA によって登録されている	現在登録済	残留減衰パッケージのみ (セクション 5.3, 5.4)

†対象動物種につき、主要投与経路を用いた完全な薬物動態試験が1試験のみ要求される。新規の投与経路が提案される場合、対象動物種を用いた最初の薬物動態試験の詳細を提出すること。ただし、新規の投与経路による新たな薬物動態試験は要求されない。

5.2. 薬物動態及び残留動態データ(最大残留基準値[MRL]の決定)

5.2.1. 概要

5.1(上記)で規定される場合、食料生産種に投与される動物用医薬品を含む製品の登録申請には、対象動物における動物用医薬品の吸収、分布、代謝/生体内変換及び排泄、並びに代謝物の存在に関するデータを提出すること。いずれの動物用医薬品についても、完全な薬物動態試験は対象種につき1試験のみが要求される。動物用医薬品が複数の異なる経路によって投与される可能性がある場合、薬物動態試験は最も一般的に用いられる経路によって行われるべきである。

薬物動態試験の目的は、物質収支(即ち、投与用量の定量的回収を達成すること)を得ることではなく、可食組織(筋肉又は標準的な割合で皮膚が付着する筋肉³、脂肪又は皮膚が付着する脂肪³、肝臓、腎臓)、乳、卵及びはちみつ中の残留についての経時的な化学的性質及び濃度を解明することである。

薬物動態及び残留動態データは、各食品の総残留及び指標残留濃度の測定、並びに動物用医薬品の投与から許容レベルまで残留が減衰する期間の任意の時点における総残留に対する指標残留の比率の決定に用いられる。また、薬物動態データは、標的組織を規定することを可能にする。標的組織とは、対象動物において総残留のモニタリングに選定された可食組織のことで、必ずしもそうとは限らないが、通常は残留の減衰速度が最も遅い組織である。動物用医薬品は、搾乳動物や採卵家禽にも用いられるため、MRLやWHPは乳や卵についても設定しなくてはならない。そのため、このような場合、可食畜肉中の残留モニタリングに選定された標的組織に加え、乳や卵が「標的組織」とみなされる。動物用医薬品が蜂に使用される場合は、はちみつを「標的組織」とみなさなくてはならない。

化学的結合した残留物が形成される場合、結合のメカニズム及び可逆性、並びに最終評価に関係するようであれば、経口摂取後のバイオアベイラビリティに関して得られるすべての情報を提示するのが賢明だと思われる。

指標残留及び標的組織は、指標残留がMRL以下である場合、各食品中の総残留が許容濃度以下となるように選定される。

5.2.2. 特定要求事項

総残留に対する指標残留比

申請者は、動物用医薬品の最終投与後の対象動物の可食組織中の動物用医薬品に関連する総残留の減衰を測定すべきである。

放射性トレーサー法は、現在、動物用医薬品に関連する総残留を測定するには最も有用である。しかし、設定された ADI によっては、微生物学的活性のある総残留を測定するため微生物学的法などの別の方法を用いる場合がある。

試料は、提案される指標残留の含有量についても(非放射標識法により)定量される。これらの残留動態試験の結果は、総残留に対する指標残留比を外挿なしに算出できなくてはならない。可食組織又は食品ごとの総残留に対する指標残留比は、1日のフードバスケット中の総残留量を算出(EDIに反映される)するのに用いられ、MRL案が勧告された場合に EDI が ADI を超えないことを検証することに使用される。

試験デザインについて

総残留減衰(残留動態)試験は、提案される対象集団を代表する、試験前に薬剤未投与の動物を用いて実施すること。製品が雌及び雄の動物の両方で使用されることを意図している場合、雌雄両方の動物を用いるべきである。供試動物に動物用医薬品を投与した後、残留分析に適した時点で可食組織及び体液を採取すべきである。

供試動物群は、データの統計解析を行うのに十分な規模とすべきである。少なくとも各時点において次の動物数からサンプリングすることが推奨される。

- 大型動物：と殺時点あたり4頭、と殺時点3～5
- 家禽：と殺時点あたり6羽、と殺時点3～5
- 魚類：と殺時点あたり10匹、と殺時点3～5
- 搾乳牛：8頭、2産以降の泌乳動物(初期泌乳期の高泌乳牛4頭及び後期泌乳期の低泌乳牛4頭)を含む
- 採卵用の家禽：各時点で10個の卵を採取するのに十分な数の鳥
- はちみつ：異なる巣箱からそれぞれ5つ以上のはちみつ試料

残留動態試験の結果は、投与された対象動物由来の食品中に残留が発生するかどうかを示し、もし残留するのであれば、動物用医薬品を適用後どれだけの期間残っているかを示すこと。

総残留に対する指標残留比は、可食組織又は食品ごとに算出し、得られた値は、以下の表3に示す反復アプローチによって適切な許容 MRL の推定に用いること。各組織についての推定値の合計(摂取された総残留量に相当)は、ADI を超えてはならないことに注意すること。

注射剤については、注射部位に残る残留物の減衰についてもモニタリングし、報告しなくてはならない。このために、動物の大きさが許せば、標準重量 500 g の注射部位組織の試料(標準的な割合で筋肉、脂肪及び筋膜組織を含む)を円柱状に採取すること。約 500 g の組織を含む円柱の寸法は、筋肉内注射では直径 10 cm、深さ 6 cm、皮下注射では直径 15 cm、深さ 2.5 cm とする。注射部位試料の分析は、筋肉と脂肪の MRL の比較を容易にするため、それぞれの組織画分(即ち、筋肉、脂肪/筋膜)について実施すること。

表 3: 許容 MRL 推定のための反復アプローチ

可食組織又は製品	一日摂取量 (kg)	指標残留濃度の中央値 (µg/kg)	総残留に対する指標残留比	可食組織又は食品ごとの残留量
筋肉 (哺乳動物、家禽、魚類 δ)	0.300	M1	R1	$(M1 \times 0.3) / R1$
脂肪 哺乳動物	0.050†	M2	R2	$(M2 \times 0.05) / R2$
家禽	0.090‡	M3	R3	$(M3 \times 0.09) / R3$
肝臓 (哺乳動物、家禽)	0.100	M4	R4	$(M4 \times 0.10) / R4$

腎臓				
哺乳動物	0.050	M5	R5	(M5 × 0.05) / R5
家禽	0.010	M6	R6	(M6 × 0.01) / R6
乳	1.50	M7	R7	(M7 × 1.50) / R7
卵	0.100	M8	R8	(M8 × 0.10) / R8
はちみつ	0.020	M9	R9	(M9 × 0.02) / R9
ADI(μg/人)	関連 ADI 値の内訳			
% 動物用医薬品に使用された合計	上記表のうち関連するフィールドの最終欄の合計 × 100 ADI			

δ 標準的な割合の筋肉及び脂肪

† 豚での標準的な割合の脂肪及び皮膚

‡ 標準的な割合の脂肪及び皮膚

乳については、MRLレベルで存在する残留物が、乳製品のスタータ培養に影響を及ぼしてはならない。この要求事項は、食品の安全に関する事項ではないが、登録された化学製品の使用が「動物、植物又は物、あるいは環境に有害な意図しない影響を及ぼさないであろう」という、APVMAの法的要求[Agvet規制のセクション14(3)(e)(iii)]を前提としている。

親油性(脂溶性)動物用医薬品(log P > 4⁴)については、畜肉中で検出される残留物は、筋肉中に散在する除去できない脂肪分に起因することから、筋肉ではなく脂肪のみにMRLを設定することが一般的な方針となっている。稀に、筋肉と脂肪中残留のいずれも定量限界値未満であるものの、モニタリング及び監視目的でMRLを必要とする場合、いずれかの組織に対する分析法の定量限界値を任意のMRLとする必要がある。

5.3. 指標残留減衰試験データ(休薬期間 Withholding Period [WHP]の推定)

動物用医薬製品の使用に関し、休薬期間(WHP)は、動物用医薬品が動物に最後に投与されてから、ヒトが摂取するために動物がと殺されるまで、又は動物から乳、卵又ははちみつが採取されるまでに必要な最低経過期間と定義される。WHPの目的は、投与動物由来の食品中の残留物濃度が、MRL以下であることを保証することである。

WHPを遵守することによって、生産者及び消費者は、投与動物由来の食品中の残留濃度がMRL以下であることを十分に保証されるべきである。

と殺のためのWHPならびにヒトが摂取する乳、卵及びはちみつの生産のためのWHPは、以下を用いた適切な残留減衰試験の結果から決定する。

- オーストラリアでの販売を意図した製剤
- 対象動物種に対する限界投与パターンでの投与

5.3.1. 特定要求事項

本文書のセクション4.1で説明したように、すべての残留試験はOECDの優良試験所原則(Good Laboratory Practice : GLP)に準拠して実施されるべきであり、国際的に認められ、定期的に更新される試験プロトコルに従うべきである。

さらに、該当する場合には、以下の詳細情報を提示すること。

- 供試動物の種/品種/供給元
- 成長速度及び乳/卵/はちみつの収率を含む投与動物の数、齢、性別、体重及び生産状況
- 動物の飼育条件：水及び摂餌消費量(特に動物用医薬品が飲水及び/又は混餌を介して投与される場合)
- 投与された動物用医薬品の剤型及び用量調整法の詳細
- 投与方法の詳細(用量[mg/kg体重で表す]、投与頻度及び投与期間)を提示しなければならない。

休薬期間(すべての対象種について)の決定のために、供試動物群は、データの統計学的評価を可能とし、対象集団を代表するのに十分な規模とすること。

- 一般的に、**乳残留試験**については、最低 20 頭の動物が必要であり、選択された動物は、通常の乳生産量の範囲を代表する必要がある。さらに、動物は標準的な酪農条件下で飼育されなければならない。個々の動物の乳生産量は、搾乳ごとに報告し、試料は指標残留の減衰プロファイルの追跡に十分な期間にわたり経時的に採取すべきである。
- **組織残留試験**について、現在の基準では、と畜時点あたり 5 頭の動物が要求される。調査中の製品の性質に基づき、残留減衰プロファイルを説明するため、適切な間隔で 4 ないし 5 時点以上のサンプリングが要求される。標準的な動物飼育条件に従うこと。
- **採卵家禽**を用いた残留試験では、卵生産量を報告し、卵は指標残留の減衰プロファイルの追跡に十分な期間にわたり採取すべきである。
- 適切な休薬期間を決定するための試験デザインの検討事項及び残留データの分析に関するさらなる情報は、APVMA のウェブサイトに掲載されている残留ガイドラインで見いだすことができる。また、申請者に対しては、試験プロトコルについて APVMA 動物医薬品残留チーム (Veterinary Residues Team) へ助言を求めることを強く推奨する。
- APVMA の残留データ要求事項と他の国際的な規制当局の残留データ要求事項とは調和しており、適切な休薬期間を決定するための残留データの分析に関する有用な情報は、EMEA のウェブサイト <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/swp/003695en.pdf> や <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/swp/047398en.pdf>、及び米国 FDA のウェブサイト <http://www.fda.gov/cvm/Guidance/1732.htm> でも確認することができる。

5.4. 分析法

申請者は、以下の試験で使用され、妥当性評価された分析法の完全な詳細を提出しなくてはならない。

- 薬物動態及び残留動態試験
- WHP 推定のために実施される試験において指標残留を決定するための分析

分析法の詳細については、最低限以下の内容を含めなくてはならない。

- 目的及び適用範囲
- 試薬
- 機器
- 試料の収集
- 試料の保管
- 試験室試料の調製
- 組織抽出液の調製及び精製
- 残留物の定量手順
- 標準化の方法などの結果の計算方法、検量線の使用(数学的モデル、パラメータ、測定範囲)
- 精度管理(内部)

標的組織中の指標残留濃度で、使用された分析法についての適切な妥当性評価データを提出しなくてはならない。妥当性評価データには次の内容が含まれなくてはならない。

特異性 Specificity - 測定対象の分析成分と分析される試料中に存在すると考えられる他の物質とを識別する分析法の能力。特異性に関する詳細は、分析法が記述される測定原理に基づいて使用されたとき、少なくとも存在すると考えられるか、又はシグナルを増加させる可能性が高い物質、例えば目的とする残留物の同族体、類似体、代謝生成物などと関連しなくてはならない。特異性に関する詳細から、実験条件下において分析法がどの程度分析成分と他の物質を識別できるか判定できるようにしなくてはならない。

真度 Accuracy - 真の値と実験手順を非常に多数回適用することにより得られる結果の平均値との一致の近さ。真度は添加したブランクマトリックス(相互に独立した複製試料)を用いた回収率実験によっても測定可能である。例えば、18のブランク測定試料を選択し、それぞれの分析成分濃度で6試料に添加することができる。

精度 Precision - 相互に独立した試験結果間の一致の近さ。精度には併行精度(繰り返し性 repeatability)と室内精度(室内再現性 within-laboratory reproducibility)があり、一般に、結果は異なる分析成分濃度における繰り返し分析(n=6)の%相対標準偏差で表される。

検出限界 Limit of Detection (LOD) - LODとは、許容される統計的確かさをもって分析成分の存在を推測することができる分析成分の最小測定量である。LODを推定する方法の1つとして、異なるソースから採取され調製されたブランク試料の代表的な数(n \geq 20)を分析法を用いて、提案された通りに測定した分析成分濃度の算術平均を求め、これにその標準偏差の3倍を加える方法がある。実質的に同等の統計学的確かさを示す他の算出方法を用いてもよい。

定量限界 Limit of Quantification (LOQ) - LOQとは、その濃度以上であれば規定された真度及び精度で測定することができる分析成分の最小測定量である。

保存及び分析中の分析成分の安定性 Stability of the analyte during storage and analysis - 試料(組織、卵、乳、はちみつ)を6ヵ月以上保存する場合、指標残留の残留物が安定であることを示すデータを提示すること。同様に、抽出及び定量手順中の指標残留の安定性を実証する必要がある。これらの特性は、報告された残留濃度が実残留濃度を真に反映しているかどうかを判定するのに重要である。

6. 用語

一日摂取許容量 Acceptable Daily Intake (ADI) : 感知可能な健康リスクを伴わずに生涯にわたって毎日摂取可能な残留物の推定量で、 μg 又は mg/kg 体重で表される。

コーデックス委員会 The Codex Alimentarius Commission (Codex) : FAO/WHO 合同食品規格プログラム(Joint FAO/WHO Food Standards Programme)の下、食品規格、ガイドライン及び実施基準などの関連文書を策定する目的で1963年に設置されたFAO及びWHOの合同機関。このプログラムの主な目的は、消費者の健康を保護し、食品貿易における規則に従った活動を保証し、国際的な政府機関及び非政府機関によって行われるすべての食品規格業務の調和を促進することである。

限界投与パターン Critical use-pattern : (製品ラベルの記載に従って)動物が暴露すると考えられる最大用量比。一般的に、動物用医薬品の説明書では、用量比を体重範囲に対する比として表している。つまり、体重範囲の下限にある動物は、標準用量比を超える割合で投薬される。体重(1 kg)あたりの動物用医薬品の用量(mg)についての最大比を限界用量比とみなす。

一日フードバスケット Daily food basket : 体重 60 kg の平均的なヒトが毎日摂取する食品の量。一日フードバスケットには以下の食品が含まれる。

哺乳動物の肉 500 g (筋肉 300 g、肝臓 100 g、腎臓 50 g、脂肪 50 g からなる)、又は鶏肉 500 g (筋肉 300 g、肝臓 100 g、腎臓 10 g、脂肪付き皮膚 90 g からなる)、又は魚 300 g (標準的な比率の筋肉と脂肪)、及び乳 1.5 L、及び卵又は卵製品 100 g、及びはちみつ 20 g

これらの摂取レベルは、組織ごとの残留濃度の中央値とともに、平均的なヒトが1日に摂取すると考えられる総残留の推定に用いられる。一日フードバスケット中の総残留量はADIを超えてはならない。

推定一日摂取量 Estimated Daily Intake (EDI) : 投与動物由来の食品中に存在する動物用医薬品の残留物に対する長期の食事暴露の推定量。推定は、残留濃度中央値及び標準一日フードバスケットを用いて算出される。

欧州動物用医薬品委員会 European Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) : 品質、安全性及び有効性に関する(EU規制に基づく)要求事項の評価を含む、動物用医薬品に関する案件に対し、欧州医薬品庁(European Medicines Agency's : EMA)の意見の立案を担当する委員会。

欧州医薬品庁 European Medicines Agency (EMA)： 欧州連合内でのヒト及び動物用医薬品の両方の評価、モニタリング及び販売承認を調整する機関。

FAO/WHO コーデックス食品残留動物用医薬品部会 FAO/WHO Codex Alimentarius Committee for Residues of Veterinary Drugs in Foods (CCRVDF)： さまざまな機能を有するコーデックス委員会のうち、食品中の動物用医薬品の残留に関する検討事項の優先順位を決定し、コーデックスに関する動物用医薬品の最大残留基準値(MRL)を提案する委員会。

食品基準規約 Food Standards Code： ヒトが摂取する食品の成分及び表示に関する一連の法的国家基準。この基準はオーストラリア・ニュージーランド食品基準局(Food Standards Australia New Zealand : FSANZ)によって策定・整備され、それぞれの州及び準州食品法の下で施行されている。パート 1.4:「食品基準法の汚染物質及び残留物」は <http://www.foodstandards.gov.au/foodstandardscode/index.cfm#FSCchapter1> に掲載されている。

農薬製品の使用における農業生産工程管理 Good agricultural practice (GAP) in the use of agricultural chemical products： 食品及び動物飼料の生産、貯蔵、輸送、販売及び加工のあらゆる段階における実際の条件下で効果的かつ確実な防除に必要な、国内で推奨され認可又は登録される化学物質の使用パターン。

動物用医薬品の適正使用規範 Good practice in the use of veterinary drugs (GPVD)： 政府機関により承認され、公的に推奨・認可される実際の条件下での動物用医薬品の使用法(優良動物用医薬品基準[good veterinary practice:GVP]とも呼ばれる)。

FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)： 国連食糧農業機関(FAO)及び世界保健機構(WHO)により合同で運営されている国際科学専門委員会。JECFAは、食品中の汚染物質、天然に存在する毒性物質及び残留動物用医薬品を含む、食品添加物の安全性を評価する。

Log P： オクタノール/水分解係数の対数を表し、動物用医薬品の脂溶性の尺度、即ち、化学物質が脂肪組織に優先的に分配されるかどうかの指標となる。

指標残留 Marker residue： 動物用医薬品の投与から許容濃度までの残留減衰時にいたるあらゆる時点において、さまざまな食品中で食品ごとに総残留濃度との関係が知られている動物用医薬品の親化合物又はその代謝物、又はこれらの組み合わせ。

最大残留基準値 Maximum Residue Limit (MRL)： 動物由来のヒトの食品中又は食品接触面の許容量として法的に許可又は容認される、動物用医薬品を登録された方法で使用した結果生じる残留物の最大濃度。この濃度は mg/kg 食品重量(液体食品の場合は mg/L)で表される。

分析法の定量限界 Method Limit of Quantification (LOQ)： その濃度以上であれば規定された真度及び精度で測定することができる分析成分の最小測定量。

MRL 基準 MRL Standard： 農薬及び動物用医薬品並びに関連物質の食品及び飼料中の最大残留基準値。APVMA の最大残留基準値ウェブサイト [website](http://www.apvma.gov.au) で入手可能。

無作用(毒性)量 No-observable-(adverse)-effect-level (NO(A)EL)： 毒性試験において、最も感受性の高い供試生物の形態、機能、成長、発達又は寿命に対し、検出可能な(通常、有害な)変化を誘発しないと認められた物質の最大濃度又は量。

残留動物用医薬品 Residues of veterinary chemicals： 対象とする動物用医薬品を投与された、又は間接投与(例：子宮内投与)により動物用医薬品を吸収した動物由来の食品中に残存する、有効成分又は分解生成物及びそれらの代謝物かにかかわらず、生物学的活性を示す全ての物質。

対象動物種 Target animal species： 動物用医薬品の使用が認可されている食糧生産動物種。

標的組織 Target tissue： 投与動物由来の食品中の全残留物のモニタリング及び規制遵守試験のために選択された可食組織。標的組織中の指標残留濃度が関連 MRL に適合する場合、一日フードバスケット中の対応する(EDIとして測定された)総残留濃度は ADI を超えない。

総残留 Total residue: 投与動物中の動物用医薬品の総残留は、親化合物、遊離代謝物、及び内因性分子に共有結合した代謝物からなる。各残留成分の相対量及び絶対量は、動物用医薬品の投与量及び動物用医薬品の最終投与後の経過時間によって、組織間で変化する。一般に、総残留は、C¹⁴で放射性標識された動物用医薬品を用いた薬物動態試験で決定される。

米国食品医薬品局動物用医薬品センターUnited States Food and Drug Administration (USFDA) Center for Veterinary Medicine (CVM): 食糧生産動物を含む動物に投与される食品添加物及び薬剤の製造及び流通を規制する米国の機関。CVMは、動物用医薬品及び飼料添加物が、意図された使用において安全かつ有効であり、投与動物由来の食品がヒトの摂取に安全であることを担保する責任を有する。

休薬期間 Withholding Period (WHP): 動物に動物用医薬品が最後に投与されてから、動物のと殺、又は動物からヒトが摂取するための乳、卵又ははちみつの採取するまでに必要な最短経過期間である。WHPの目的は、投与動物由来の食品中の残留物濃度が MRL 以下であることを保証することである。

7. 参考文献及び補足資料

記載の内容は本文書の発行当時のものである。申請者は常に発行文書が最新版であることを確認の上、入手すること。

一日摂取許容量(ADI)リスト(農薬及び動物用医薬品の一日摂取許容量)

オーストラリア医薬品行政局(Therapeutic Goods Administration、キャンベラ)

参照先: <http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/ocs-adi-list.htm>

農薬及び動物用医薬品法(1994年)(*Agricultural and Veterinary Chemicals Code Act 1994*)。APVMA(キャンベラ)。

参照先: APVMA website legislation page.

APVMA MRL 基準: 食品及び飼料中の最大残留基準。APVMA(キャンベラ)。

参照先: APVMA website MRL Standards page

APVMA 残留ガイドラインは APVMA website MRL Standards page で参照可能。

オーストラリア連邦 農薬・動物用医薬品官報(APVMA 官報)。APVMA(キャンベラ)。

参照先: APVMA website Gazette page

EMA (CVMP) 休薬期間の調和に向けてのアプローチに関するガイダンスノート(Note for Guidance: Approach towards harmonisation of withdrawal periods)

参照先: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/swp/003695en.pdf>。登録ソフトウェアは、

<http://www.emea.eu.int/index/indexv1.htm> にアクセスし、Guidance documents<>Safety<>Adopted Guidelines<>

EMA/CVMP/563/02 の順にクリックすることでダウンロード可能。

EMA (CVMP) 乳の休薬期間決定に関するガイダンスノート(Note for Guidance for the Determination of Withdrawal Periods for Milk)。

参照先: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/swp/047398en.pdf>。登録ソフトウェアは、

<http://www.emea.eu.int/index/indexv1.htm> にアクセスし、Guidance documents<>Safety<>Adopted Guidelines<>

EMA/CVMP/231/00 (Rev1) の順にクリックすることでダウンロード可能

食品及び飼料中の最大残留基準値の推定に係る残留農薬データの提出及び評価に関する FAO マニュアル(1997年)(FAO Manual on the Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed)、FAO(ローマ)

国立試験認可者協会 (National Association of Testing Authorities: NATA) – オーストラリアでの GLP 認可に関する情報は www.nata.asn.au で参照可能。

OECD 優良試験所基準原則 (Principles of Good Laboratory Practice: GLP) ガイダンス文書 No. 1。

参照先: OECD のウェブサイト <http://www.oecd.org/ehs/>

USFDA (動物用医薬品センター) 休薬期間の設定に関するガイドライン (Guideline for Establishing a Withdrawal Period)

参照先: <http://www.fda.gov/cvm/Guidance/1732.htm>.

注釈

1. 従来、長期食事暴露量の推定には、MRL (案) 濃度での食品中の残留濃度を用いていた。しかし、MRL が、投与動物のある組織に存在する指標残留量の高パーセンタイルの推定上限値を示す単一の濃度であることを考えると、MRL は、生涯にわたり消費者に起こり得る残留への長期暴露を示す現実的な指標とは言い難い。消費組織中の残留濃度は日によって変動し一定の分布を示すことから、残留濃度の中央値は、長期間にわたる中心傾向の推定値として最適である。
詳細は <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary66.pdf> に掲載されている。
2. 関連する科学的根拠は、受け入れられている科学的原則、ピア・レビューを行うジャーナルで発表されたデータ、関連する教科書、関連する症例報告、あるいは関連する臨床試験に基づく根拠と定義され、「関連する」とは、動物用医薬品又は動物用医薬品製品に関連するもの、又は請求及び使用パターンに関連することを意味する。関連する科学的根拠は、補足資料が添付されなくてはならない。
3. 豚、家禽及び魚類の場合
4. 食品及び飼料中の最大残留基準値の推定に係る残留農薬データの提出及び評価に関する FAO マニュアル (FAO Manual on the Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed: FAO, Rome, 1997, p.40) には、log P 値が 4 を超える場合、一般に化合物は脂溶性とみなされると明示されている。

改訂履歴

改訂日	改訂内容
2005年7月1日	第1版 • MORAG の初版 – 元となる動物用医薬品要求項目シリーズ (<i>Vet Requirements Series</i>) からの変更はなし。
2005年10月1日	第2版 • 変更なし。
2006年6月1日	第3版 • 内容の全面改訂
2007年7月1日	第4版 • レイアウトのマイナーチェンジ

資料③: Residue Guideline No. 26: Veterinary drug
residue analytical methods

残留ガイドライン No. 26: 動物用医薬品残留分析法

本文書の原文は、オーストラリア政府農薬・動物用医薬品局により、下記のタイトルで英語で公表されたものである。

Residue Guideline No. 26: Veterinary drug residue analytical methods

https://archive.apvma.gov.au/transition/guidelines/rgl_26.php

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に応じ原文を参照ください。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます

動物用医薬品残留分析法

残留ガイドライン No. 26

NRA (National Registration Authority オーストラリア政府登録局)

本ページの内容:

- 緒言 Introduction
- 分析法の種類 Types of Analytical Methods
- 分析法の目的 Objectives Of Analytical Methods
- 分析法の開発 Development Of Analytical Methods
- 分析法の妥当性評価 Validation Of Analytical Methods
- 分析法の報告 Reporting Of Analytical Methods
- 不安定/急速分解性薬剤の分析 Analyses For Unstable/Rapid Breakdown Products
- 参考文献 Bibliography

緒言 Introduction

本ガイドラインは、動物用医薬品を登録する際に、残留分析法を開発するか/又は使用する分析化学者の実践的な支援を提供するために作成されたものである。動物用医薬品の性質上、多くの農薬に用いられている多成分分析法を使用できないことが多い。これは、動物用医薬品の物理化学的特性がクラス間で大きく異なり、場合によっては、たとえ同じクラスに属していても個々の化合物間で大きく異なるためである。このような違いにより、比較的単純なバイオアッセイや免疫学的試験から複雑な機器分析まで、多様な分析技術の利用が必要とされる。残留動物用医薬品の同定及び定量にどの分析法が適合するかは、分析法の意図する目的に依存する。

申請には、日常的なモニタリングのための分析法と規制施行のための分析法を含めるべきである。場合によっては、この分析法は、MRL(最大残留基準値)の設定を申請するために実施される試験において、残留物を定量するのに用いられる方法であるかもしれない。その他、規制目的に別の分析法が要求される場合がある。

分析法の種類 Types of Analytical Methods

現在、残留動物用医薬品の定量に利用できる分析法は次の通りである。

- **バイオアッセイ Bioassays:** オーストラリアでは、尿、乳及び腎臓中の抗菌剤の有無を日常的にスクリーニングするため、広域スペクトルバイオアッセイが広く用いられている。バイオアッセイは、現在も阻害物質の有無について多数の試料をスクリーニングするのに重要である。一般に、これらの方法は、規制目的の定量データの作成には適さない。動物用医薬品、特に抗生物質の残留を定量するために、特定のバイオアッセイ又はイムノアッセイが用いられる。
- **機器分析法 Instrumental methods:** GLC や HPLC は、様々な検出器と組み合わせて、ほとんどの動物用医薬品の日常分析及びその残留物の同定・定量の両方に用いられる。機器分析法の特異性及び感度が十分であれば、新規抗菌剤の機器定量の方がバイオアッセイやイムノアッセイによる定量よりも好ましい。
- **その他の機器分析法 Other instrumental methods:** 走査型 TLC や分光法などの機器分析法は、残留動物用医薬品の定量に用いることはあまり一般的ではない。

バイオアッセイ、免疫学的試験及び機器分析法のどれを選ぶかは、それぞれの分析法が目的の作業に適合しているかどうかによる。どの分析法が適切かは状況により判断する。NRA では、特異性が高く定量可能な機器分析法を推奨する。

分析法の目的 Objectives Of Analytical Methods

動物用医薬品の機器分析法を開発する際には、以下の方針が重要であり、これらを満足させるべきである。

- ・実証済みで許容可能な抽出効率を有する。
- ・残留定義に含まれるすべての成分を測定(同定及び定量)する能力を有する。
- ・妨害物質が定量限界(LOQ)の30%を決して超えないような十分な特異性を有する。
- ・許容可能な精度及び真度を有する。
- ・登録申請の対象となり得るすべての動物種を網羅する。
- ・登録申請に関連する組織及び食品(筋肉、肝臓、腎臓、脂肪、卵、乳及びはちみつなど)に適用される。

バイオアッセイ及びイムのアッセイの場合、上記目標のうち関連するもののみ満足させる必要がある。

分析法の開発 Development Of Analytical Methods

標準分析法が利用できない場合、あるいは特定の要件を満たすために既存の分析法に修正が必要な場合には、分析法を開発する必要がある。使用される分析法が標準手順であるか、既存の分析法の修正であるか、全く新規の分析法であるかにかかわらず、いずれの場合も、試験室は分析法の性能特性が NRA の許容基準を満たすことを実証すべきである。

分析法の開発において考慮すべき事項は以下の通りである。

- ・分析法は登録申請内容に従って、**関連する組織**(筋肉、肝臓、腎臓及び脂肪など)及び**動物性食品**(卵、乳及びはちみつなど)を**すべて網羅する必要がある**。乳が含まれている場合、乳脂肪を物理的に分離した後、乳の脂肪相と水相間の残留物の分配を測定しなくてはならない。MRL は、化学物質の物理化学的性質に応じて乳脂肪か全乳のいずれかに適用される。薬剤の使用に産卵鶏への投与が含まれる場合、卵を分析法の開発に含めるべきである。卵黄と卵白間の残留物の分配を測定する必要がある場合、分析法の開発は全卵を用いて行うべきである。
- ・分析法は、**残留の定義に対応し**、残留の定義に含まれる全成分を測定(同定及び定量)できる必要がある。分析法が残留の定義に対応しない場合、残留データを作成するためには適切でない可能性がある。

残留の定義に関する情報は、残留ガイドライン No. 6: *MRL 設定のための残留定義(Residue Guideline No. 6: Definition of residues for the purpose of setting an MRL)*に記載されている。特定の代謝物又は分解生成物を残留の定義に含めることは、それらの毒性学的プロフィールや生成の程度に依存する。一般に、残留の定義に含める資格を得るためには、毒性学的に有意であり、かつ全残留物の5%を超えなければならない。

バイオアッセイは、残留に関して多数の試料のスクリーニングには適しているが、一般に、MRL 設定の目的には受け入れられない。機器分析法が用いられる場合、残留の定義は、測定された部分構造(moiety/moieties)、即ち親化合物及び/又は1つ以上の代謝物に基づくべきである。特定の状況によっては、残留の定義は、親化合物及び/又は代謝物を他の誘導体に化学変換して測定する必要がある。

- ・分析法は**十分に妥当性評価がなされるべきである**。分析法が使用されるすべてのマトリックスに対して妥当性評価データが必要である。対照試料及び添加試料のデータが必要となる。分析法妥当性評価については以下で詳述する。
- ・分析法の**抽出効率**は、真の分析成分濃度を測定するための重要な要素であることから、実残留試料を用いて決定する必要がある。分析法は、放射性標識試験[1]のための試料の分析によって、又は実残留試料を異なる溶媒及び/又は緩衝液の組み合わせを利用して一連の徹底抽出をすることによって実証された抽出手順を採用すべきである。

前者については、分析法の開発に放射性標識薬剤を用いた代謝試験と関連付けるのも一つの手段である。

ジェネリック動物用医薬品に関する申請に用いられる分析法の抽出効率についても、検討し実証する必要がある。これは、食品分析技能評価スキーム (Food Analysis Performance Assessment Scheme: FAPAS) や政府残留調査 (National Residue Survey: NRS) プログラムのような技能試験プログラムを通じて、既存の分析法と同等であることを実証することで達成可能である。ジェネリック動物用医薬品のための分析法を開発する必要がある申請者は、可能であれば、先ず MRL 設定に使用された抽出手順及び溶媒と同じものを使用することが望ましい。あるいは、Codex 又は公表された分析法をガイダンスとして使用できる場合がある。このような検討には、徹底抽出及び/又は異なる溶媒を使用したときの抽出効率の比較が含まれる。マトリックスから残留物を放出する他の方法の使用についても検討すべきである (例: 組織からネオマイシンを放出させる過塩素酸の使用 [2]、抱合体残留物を遊離させるためのグルクロニダーゼの使用、タンパク結合残留物を放出させるプロテアーゼの使用)。

- **抽出液中の残留物の安定性**についても、特に、分析法が 1 回の作業セッションで完了できない場合、又はオーバーナイトで抽出/精製が行われる場合には示す必要がある。これは特定の種類の化合物でとりわけ重要である。
- **分析法の感度**は、意図する目的に適合するものでなくてはならない。例えば、MRL がすでに設定されている場合や輸出入に関係しない場合は MRL の 1/2 又はそれ以下の濃度を検出する感度が必要である。しかし、データが MRL 又は WHP (休薬期間) のいずれかを変更する根拠として、あるいは ESI (Export Slaughter Intervals 輸出向けと畜保留期間) の設定に用いられる場合、分析法は MRL の 1/2 未満の濃度の残留物を検出する必要がある (通常 LOQ 又は LOD までの残留物が報告される)。
- **回収率データ**は、試験試料中で生じる残留濃度の範囲全体にわたって作成する必要がある、最低限、LOQ 及び提案された MRL での回収率を含めるべきである。分析法を妥当性評価するためには 1 濃度だけの回収率では不十分である。内標準を使用する分析では、分析成分と内標準の両方の回収率データを提供しなくてはならない。
- **バイオアッセイ及びイムノアッセイ**は、特異性を判定し、残留の定義に見合う定量を実証するために、機器分析法と比較する必要がある。バイオアッセイ及び/又はイムノアッセイが残留の定義を定量できない場合、登録目的の残留データの作成には適さない。

本ガイドラインの読者は、2003 年 1 月以降、オーストラリアで実施される、動物フェーズ及び試験室フェーズの両方を含むすべての残留試験は、優良試験所基準 (Good Laboratory Practice :GLP) 遵守が義務付けられる可能性が高いことに留意する必要がある。海外試験は、同等の GLP 基準が適用される。

分析法の妥当性評価 Validation Of Analytical Methods

NRA に提出される分析法はすべて妥当性評価がなされているべきである。Codex [3] は、動物用医薬品の審議において FAO [4]/WHO [5] 合同食品添加物専門家委員会 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: JECFA) によって評価された分析法の性能特性を規定している。FAO/IAEA [6] 合同作業部会は、現在、動物用医薬品残留分析法の単一試験室妥当性評価に関するガイドラインを作成中であるが、本稿の執筆時点ではまだ完成していない。オーストラリアでは、国立試験認可者協会 (National Association of Testing Authorities: NATA) が分析法妥当性評価に関するいくつかのガイドラインを公表しており、詳細は NATA のウェブサイト [7] のテクニカルノート No 17 に掲載されている。

分析法妥当性評価では、以下の項目について考慮する必要がある。

- **標準検量線 Standard calibration**: 参照化合物は、既知の純度のものでなければならない。標準液の安定性を測定すべきである。抗菌性化合物によっては、新鮮な希釈液を毎日調製しなければならない。直線性は、LOQ から試料抽出液中に見込まれる最大濃度又は MRL (案) のいずれか高い方までの範囲で、少なくとも 3 点の標準濃度を用いて評価すべきである。
- **分析法の真度 Accuracy of the method**: 分析法の真度とは、真値と回収率で補正された結果の平均値との一致の近さである。後者は、既知量の化合物を添加した試料を分析することにより得られる。真度は、LOQ かそれよりやや高濃度で決定されるべきである。
- **検出限界 Limit of detection**: 分析法の LOD とは、規定の試験条件下において検出及び確認は可能であるが、必ずしも定量化できるわけではない試料中の分析成分の最低濃度である。機器分析法では、この限界を確実に確立するには、通常、S/N (シグナル対ノイズ) 比 3:1 が受け入れられる。しかし、この値は目安に過ぎず、マトリックスからの共抽出物によるベースライン干渉によって悪影響を受ける場合がある。

- **分析定量限界 Limit of analytical quantitation**: 分析法の LOQ とは、許容可能な確かさをもって、試料中で定量可能な残留物の最低濃度である。MRL の設定を目的とした場合、LOQ は 定量的な回収が達成される最低濃度である。従って、どのような分析法であっても、提案された LOQ での回収率データを提出しなくてはならない。提出がなければ、LOQ は、食品について提出された許容可能な回収率データでの最低濃度と等しいとみなされる。

検出限界の推定に関する情報の詳細については、申請者は、「分析化学における検出、ACS シンポジウムシリーズ 361 (Detection in Analytical Chemistry, ACS Symposium Series 361)」及び「残留ガイドライン No. 4: 分析定量限界付近での最大残留基準値案について (Residue Guideline No. 4: Maximum residue limit proposals 'at or about the limit of analytical quantitation')」を参照のこと。

- **分析法の特異性 Specificity of the method**: 特異性とは、測定対象の分析成分と試験マトリックス中に存在すると考えられる他の物質とを識別する分析法の能力である。特異性の測定には、対象物質及び類似物質の代謝に関する知識、並びに適切な参照標準が必要となる。

実際には、分析法の特異性は、いくつかの方法の中の 1 つの方法で示すことができる。第一に、クリーンアップ後の対照抽出物について行われる試験において、LOQ の 30% を超える共抽出物質による干渉がないことを示すべきである。第二に、構造的に類似した物質に対する特異性は、クロマトグラフィー分離又は他の適切な測定方法により、in vitro で示すのが最適である。第三に、上記が上手くいかない場合は、実残留組織の検討が適切かもしれない。

- **分析法の精度 (回収率の範囲) Precision of the method (recovery range)**: 精度とは、繰り返し行われた試験間の変動をいう。精度の 2 つの尺度は、繰り返し性 (併行精度 repeatability) 及び再現性 (室間精度 reproducibility) である。繰り返し性とは、同一試験室で、同一実施者が行った分析法で得られた、試験結果間の変動をいう。再現性は、異なる実施者、及び好ましくは異なる試験室による変動の尺度である。回収率の変動係数 (標準偏差を算術平均で除したものとして定義される) は、精度の尺度とみなすことができる。

動物用医薬品について検討する際の分析法の妥当性評価の許容基準を下表にまとめる [8]。

分析成分の濃度	繰り返し性 CV%	再現性 CV%	真度 平均回収率%の範囲
≤0.001 mg/kg	36	54	50-120
>0.001 - 0.01 mg/kg	32	46	60-120
>0.01 mg/kg - 0.1 mg/kg	22	34	70-120
>0.1 mg/kg - 1 mg/kg	18	25	70-110
>1 mg/kg	14	19	70-110

上記の表の繰り返し性 (併行精度) 及び再現性 (室間精度) の CV% 値は、特殊な状況が特定の分析法に関連している場合を除き、それぞれの濃度で許容される最大値である。

分析法の報告 Reporting Of Analytical Methods

以下の情報を報告すべきである。

1. 装置及び機器の詳細、使用した試薬類、試料調製、抽出及びクリーンアップ手順、並びに分析成分の定量を含む分析法の完全な説明。
2. 生データを含む妥当性評価結果の完全な詳細。
3. 検討された試験系及び/又は使用した溶媒を含む、抽出効率に関する試験の詳細及びその結果。
4. 代表的なクロマトグラム。提出すべき最低限の情報は、標準品、未処理試料、添加した未処理試料、及び薬剤投与動物から採取した各マトリックスについての試料である。

上記の 2 及び 3 のデータは、分析法レポートの付録として添付することができる。

同じ分析法が用いられる場合は、その後の NRA への提出には、その分析法のコピーを添付すべきである。

不安定/急速分解性薬剤の分析

Analyses For Unstable/Rapid Breakdown Products

不安定な薬剤分子の分析を検討する場合、適切な分析法と安定した参照物質を使用することが重要である。不安定な化合物が他の化合物(代謝物、基礎原料(base materials))に分解する場合、分解生成物が安定であれば、分解生成物の残留データを提示しなくてはならない。ただし、残留物を生じない(即ち、分解生成物が揮発性であるなど)ことや、生じた化合物に有意な毒性が認められないことを証明又は説明できる場合を除く。残留分析の目的のために、意味のある分析が実施されるには、該当するマトリックス中の残留物の安定性が不可欠である。不安定物質の分析には困難が予想されるので、不安定物質の分析を実施する前に、NRAの化学物質・残留評価セクション(Chemistry and Residues Evaluation Section)に連絡し、適切な措置を協議することが望ましい。

参考文献 Bibliography

1. Residue Guideline No 19: *Residue analytical method*
2. Residue Guideline No 6: *Definition of residues for the purpose of setting an MRL.*
3. Residue Guideline No. 4: *Maximum residue limit proposals 'at or about the limit of analytical quantitation'.*
4. NATA Technical Note 17: *Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods.*
5. *Detection in Analytical Chemistry - Importance, Theory and Practice.* Ed. Lloyd A Currie; ACS Symposium Series 361, (1988).

詳細は下記に問い合わせのこと。

McDougall

Senior Residues Evaluator(上級残留評価者)

Phone: (02) 6210 4700

[1] IUPAC Reports on Pesticides (40). Bound Xenobiotic Residues in Food Commodities of Plant and Animal Origin. MW Skidmore *et al.* *Pure and Applied Chem.*, (1998). Vol 70, No 7, Recommendation 6, p 1425.

[2] JAOAC (1999) 82: 61-67. Determination of neomycin in animal tissues by liquid chromatography.

[3] Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Residues of veterinary drugs in food, Volume 3.

[4] Food and Agriculture Organization of the United Nations

[5] World Health Organisation

[6] International Atomic Energy Agency

[7] <http://www.nata.asn.au/> にアクセスし、「Free Library」と「Technical Notes」をクリックする。

[8] 1999年ハンガリーで開催された AOAC/FAO/IAEA/IUPAC 専門家会議で提案された許容基準から採用。

資料④: Australian Government

Australian Pesticides and Veterinary
Medicines Authority

Analytical methodology

オーストラリア政府 農薬・動物用医薬品局
登録及び許可 動物用医薬品

分析法

本文書の原文は、オーストラリア政府農薬・動物用医薬品局により、動物用医薬品の承認審査に関するガイドラインとして、下記のタイトルで英語で公表されたものである。

Analytical methodology

<https://apvma.gov.au/node/723>

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に



分析法

本ガイドラインは「動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力ガイドライン 49 (VICH GL49)」
「International Co-operation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal
Products guideline (VICH GL) 49」に基づくもので、動物用医薬品の残留減衰試験に使用される分析法の妥当性評価に
適していることが、欧州連合、日本、米国、オーストラリア、ニュージーランド及びカナダにより認められた評価基
準の概要を提供することを目的としている。

VICH GL49 は、食糧生産動物に使用される動物用医薬品の残留情報に関し、国又は地域の規制当局による相互受
け入れを円滑にするために生まれたシリーズの 1 つである。本ガイドラインは、当初、欧州連合、日本、米国、オース
トラリア、ニュージーランド及びカナダにおける動物用医薬品残留を評価するための現在の国又は地域の要求及び
勧告事項を考慮して作成された。

VICH GL 49 は、残留動物用医薬品の定量に使用される分析方法論に関して、オーストラリアのほとんどの勧告事項
をカバーしているが、これとは別にオーストラリア独自の追加の検討事項がいくつか存在する。これらの追加の分析
方法論は、本書で詳術されている。

1. 残留分析法に関するガイダンス
2. 残留分析法の妥当性評価に関するガイダンス

1. 残留分析法に関するガイダンス

本ガイドラインは、動物用医薬品の残留分析法（指標残留減衰試験で残留を測定するために開発された分析法）の評
価のために開発された分析手順のみに使用されることを意図している。規制目的のモニタリング検査手順の妥当性評
価に必要な評価基準を規定することは意図していない。

1.1. 緒言

残留データは、最大残留基準値の設定、既存の最大残留基準値に適合していることの実証、適切な休薬期間の決定
及び輸出向けと畜保留期間の判断に用いられる。食糧生産動物種の内部又は表面に投与される動物用医薬製品の
登録を裏付ける残留データに加え、残留データの作成に使用された分析法を提供する必要がある。

動物用医薬品のための分析法を開発する場合、分析法は以下のようにすべきである。

- 残留の定義又は指標残留に含まれる全成分を測定（同定、定量及び確認）する能力を有する。
- 妨害物質が分析定量限界の 30%を決して超えない十分な特異性を有する。
- くり返し性（併行精度）が示されている。
- 薬剤が投与された動物から得られるすべての組織又は食品をカバーする。

1.2. 分析法の種類

現在、残留動物用医薬品の測定に利用できる分析法は次の通りである。

- バイオアッセイ： オーストラリアでは、尿、乳及び腎中の抗菌剤の有無を日常的にスクリーニングするため、広域スペクトルバイオアッセイが広く用いられている。バイオアッセイは、現在も多数の試料中の阻害物質をスクリーニングするのに重要である。一般に、これらの方法は、規制目的の定量データの作成には適さない。特定のバイオアッセイ又はイムノアッセイが、動物用医薬品、特に抗生物質の残留を定量するために使用される。
- 機器分析法： 様々な検出器を付けたガスクロマトグラフィー又は高速液体クロマトグラフィーなどの分析法は、ほとんどの動物用医薬品の日常的な分析及びそれらの残留物の確認及び定量の両方に使用できる。機器分析法の特異性及び感度が十分であれば、新規抗菌剤の機器定量は、バイオアッセイやイムノアッセイによる定量よりも好ましい。
- その他の機器分析法： 走査型薄層クロマトグラフィーや分光法などの分析法が残留動物用医薬品の定量に用いられる頻度は低い。

バイオアッセイ、免疫学的試験及び機器分析法のどれを選ぶかは、それぞれの分析法が目的の作業に適合しているかどうかによる。状況がどの分析法が適切かを決定する。APVMA では特異性が高く定量可能な機器分析法を推奨する。

1.3. 分析法の目的

動物用医薬品の機器分析法を開発する場合、分析法は以下の点が重要である。

- 実証済みの許容される抽出効率を有する。
- 残留の定義又は指標残留物に含まれるすべての成分を測定(同定及び定量)する能力を有する。
- 妨害物質が定量限界の30%を決して超えないだけの特異性を有する。
- 許容可能な精度及び真度を有する。
- 登録申請の対象として提案されるすべての動物種をカバーする。
- 登録申請に関連する組織や食品(筋肉、肝臓、腎臓、脂肪、注射部位、卵、乳、はちみつなど)に適用される。

バイオアッセイ及びイムのアッセイの場合、上記目標のうち関連する項目を満足させる必要がある。

1.4. 分析法の開発

試験室は、分析法の性能特性が後出の「残留分析法の妥当性評価に関するガイダンス」の項に記載の許容基準を満たすことを実証すべきである。

分析法の開発において考慮すべき事項は以下の通りである。

- 分析法は、登録申請案に従って、関連する全ての組織(筋肉、肝臓、腎臓及び脂肪など)及び動物性食品(卵、乳及びはちみつなど)をカバーすべきである。乳が含まれている場合、分析法は全乳に適用されるべきである。薬剤が産卵鶏に使用される場合、分析法の開発に卵を含めるべきである。卵黄と卵白間の残留物の分配を測定することは可能であるが、分析法の開発は全卵(殻を除く)を用いて行うべきである。

- 分析法は残留の定義又は指標残留に対応し、残留の定義に含まれる全成分を測定(同定及び定量)できるようにする必要がある。分析法が残留の定義に対応しない場合、残留データの作成に適切でない可能性がある。
- バイオアッセイは、多数の試料について残留をスクリーニングすることは許容可能であるが、一般に、最大残留基準値を設定する目的には受け入れられない。機器分析法を使用する場合、残留の定義又は指標残留は、残基(moiety)又は測定された残基(すなわち、親化合物及び/又は1つ以上の代謝物)に基づくべきである。ある特定の状況によっては、残留の定義や指標残留は、親化合物及び/又は代謝物を他の誘導体に化学変換して測定する必要がある。
- 分析法は、完全に妥当性評価されるべきである。分析法が使用されるすべてのマトリックスについての妥当性評価データを提示すべきである。さらに、対照試料及び添加試料のデータを提供すべきである。分析法妥当性評価については、後述の「残留分析法の妥当性評価に関するガイダンス」の項で詳細に述べる。
- 分析法の抽出効率、真の分析成分濃度を測定するための重要な要素であることから、実残留試料を用いて決定されるべきである。分析法は、放射性標識試験のための試料の分析、又は実残留試料の連続抽出に異なる溶媒及び/又は緩衝液の組み合わせを利用した一連の徹底抽出により実証された抽出手順を採用すべきである。分析法の開発に、放射性標識薬剤を利用した代謝試験と関連付けることは、前者を達成するための1つの手段である。
- ジェネリック動物用医薬品に関連する申請に用いられた分析法の抽出効率についても、検討して実証すべきである。これは、国家残留調査プログラムなどの技能試験プログラムを通じて、既存の分析法と同等性を実証することによって達成できる。ジェネリック動物用医薬品の分析法を開発する必要がある場合、可能であれば、先ず最大残留基準値の設定に使用された抽出手順及び溶媒と同じものを使用することが望ましい。あるいはまた、コーデックス委員会で出版された方法又はその他の出版された分析法をガイダンスとして使用できる場合がある。このような検討には、徹底抽出及び/又は異なる溶媒を使用したときの抽出効率の比較が含まれる。マトリックスから残留物を放出するための他の方法の使用についても検討すべきである(例:組織からネオマイシンを放出させる過塩素酸の使用、抱合体残留物から遊離させるグルクロニダーゼの使用、タンパク結合残留物を放出させるプロテアーゼの使用)。
- 特に分析法が1回の作業セッション中に完了できない場合、又は一夜かけて抽出又は精製が行われる場合、分析法は、抽出液中の残留物の安定性を実証すべきである。これは特定のクラスの化合物でとりわけ重要である。
- 分析法の感度は、意図した目的に適合すべきである。留意点として、最近では、モニタリングや監視を行う試験室において、タンデム質量分析計付き液体クロマトグラフィーによる検出法が日常的に用いられており、最新の分析法は同等の選択性と感度を有する必要がある。データが最大残留基準値又は休薬期間のいずれかを変更する根拠、あるいは輸出向けと畜保留期間の設定の根拠として用いられる場合、分析法はその定量限界/検出限界濃度で残留を検出できる必要がある。さらに、試験室は、残留データの統計解析を補足するために分析法の検出限界と定量限界の間の値を定量し測定値を報告することが求められる。
- 試験試料中に生じる残留濃度の全範囲を網羅する回収率データを作成すべきであり、最低でも、定量限界及び最大残留基準値(案)での回収率を含めるべきである。分析法を妥当性評価するためには、1濃度のみの回収率データでは不十分である。内標準を使用する分析では、分析成分と内標準の両方の回収率データを提示すべきである。
- バイオアッセイ及びイムノアッセイは、特異性を判断し、残留の定義の定量が同等であることを示すために機器分析と比較する必要がある。バイオアッセイ又はイムノアッセイが残留の定義を定量できない場合、登録目的のための残留データの作成には不適當である。

オーストラリアで実施されるすべての残留試験は、動物試験及び試験室段階の両方について GLP (good laboratory practice) に準拠し行われるべきである。オーストラリアで実施された試験については、オーストラリア GLP 基準遵守モニタリングプログラム (GLP compliance monitoring program) で認定されている施設で実施された試験のみが GLP に準拠していると主張することができる。海外の試験が GLP 準拠を主張するためには、当該国の GLP 遵守モニタリングプログラムに従い認定された施設によって実施されたものでなくてはならない。

1.5. 分析法の報告

申請者は妥当性評価された使用した分析法の完全な詳細を提供すべきである。

- 薬物動態及び残留動態試験
- 休薬期間を推定するために実施された試験における指標残留の測定

以下は、使用している分析手順の妥当性を指示するために通常含めるべき情報である。

- 分析法の完全な説明には以下が含まれる。
 - 目的及び適用範囲
 - 試薬
 - 器具及び装置
 - 試料の採取
 - 試料の保管
 - 保管中の残留物の安定性
 - 試験室試料の調製
 - 組織抽出物の調製及び精製
 - 残留の測定手順
 - 結果の計算法、例えば、標準化法、検量線 (数学モデル、パラメーター、測定範囲) の使用
 - 精度管理 (内部)
 - 参照標準物質の純度を確認する文書
- 生データを含む妥当性評価結果の完全な詳細 (下記の「残留分析法の妥当性評価に関するガイドライン」の項を参照のこと)
- 試験系及び/又は使用した溶媒を含む、抽出効率に関する試験の詳細及び結果
- 代表的なクロマトグラム—提出すべき最小限の情報には、標準品、薬剤未投与の試料、標準品を添加した薬剤未投与の試料、及び薬剤が投与された動物から採取した各マトリックスについての試料が含まれる。

2. 残留分析法の妥当性評価に関するガイダンス

分析法の妥当性評価の目的は、その手順が正しく適用された場合に、目的に合った結果を与えることを実証することである。この文書の目的は、残留分析及び代謝試験の実施に用いられる分析手順を妥当性評価するための実施手順について説明することである。これらの手順は、動物用医薬品又は動物用医薬品を含有する製品の化学及び製造に使用される分析方法に適応することを意図していない。

2.1. 性能特性 Performance characteristics

一般に、分析法妥当性評価は特定の性能特性を有する。これらの性能特性は、以下の通り定義される。

- 標準較正 standard calibration
- 線形性 linearity

- 真度 accuracy (訳者注: accuracy は一般に「精確さ」をさすが、この文書では真度 (trueness) として取扱う。)
- 精度 precision
- 検出限界 limit of detection
- 定量限界 limit of quantitation
- 選択性又は特異性 selectivity or specificity
- マトリックス中での安定性 stability in matrix
- 保存安定試験の実施 conduct of storage stability trials
- 工程試料の安定性 process sample stability
- 頑健性 robustness

これらの性能特性は、動物用医薬品残留減衰試験での使用を意図した分析法の妥当性評価に適用されるので、これらの各特性を以下に説明する。

2.1.1. 標準校正 Standard calibration

参照化合物は既知の純度であるべきである。参照化合物の安定性を確認すべきである。いくつかの抗菌性化合物については、新鮮な希釈液を毎日調製すべきである。直線性は、定量限界から試料抽出液に見込まれる最大濃度又は最大残留基準値(案)のいずれか高い方までの範囲で、少なくとも 5 点の標準濃度を用いて評価すべきである。

2.1.2. 線形性 Linearity

マトリックス(組織、乳、卵又ははちみつ)中で予測される濃度範囲にわたって、直線関係が評価される検量線を作成すべきである。標準検量線は、方法に応じて 3 つの形式で作成することができる: 溶媒又は緩衝液中の標準、対照マトリックス抽出液に添加された標準、及び対照マトリックスに添加され抽出手順により処理された標準。直線性は、最低 5 点の異なる濃度を用いて、既知の濃度に対する応答についての、直線、多項式又は他の(適切な場合)回帰プロットによって記述すべきである。重み係数の受け入れ可能性は、3 回の測定ランにおいて残差がランダム分布しているかどうかを評価することにより判断されるべきである。残差の評価は、少なくとも 3 回の独立した測定ランで行うべきである。

検量線の推奨される許容基準は、検量線の形式に依存する。対照マトリックスに添加され、(規定の)手順で処理されて作成された標準検量線は、試料と同じ受け入れ基準に従う(「精度」の項参照)。溶媒/緩衝液中の標準又は対照マトリックス抽出液に添加された標準により作成された標準検量線は、より厳格な許容基準(すべての濃度で繰り返し性(併行精度)15%以下、但し、定量限界以下では 20%以下が許容可能)が要求される。

分析法には、直線性を得るために対数変換を要する方法(例:微生物学的定量法)や、濃度と応答間の関係を確立するためにより複雑な数学的関数を要する方法[例:エンザイム免疫アッセイ (ELISA) やラジオ免疫アッセイ]がある。そのような関数を使用するときには、改めて、作成された残差を評価することにより、選択された関数の受け入れ可能性を検証することが望ましい。

2.1.3. 真度 Accuracy

真度とは、分析成分の濃度の真値と実験手順を非常に多数回適用して得られる結果の平均値との一致の近さをいう。また、真度は、添加したブランクマトリックス(相互に独立した複製試料)を用いた回収率実験によっても決定することができる。例えば、18 個のブランク試験試料を選択し、それぞれの分析成分濃度で 6 個に添加することができる。真度は、系統誤差(分析法バイアス)及び分析成分の回収率(%回収率として測定)に密接に関連している。残留分析法の推奨される真度は、分析成分の濃度に依存する。真度は、表 1 に示す範囲を満たすことが望ましい。

表 1: 分析成分の濃度と許容される真度の範囲

分析成分の濃度 (μg/kg)*	真度の許容範囲
< 1 μg/kg	-50% ~ +20% (50~120%)
≥ 1 μg/kg	-40% ~ +20% (60~120%)
≥ 10 μg/kg < 100 μg/kg	-30% ~ +10% (70~110%)
≥ 100 μg/kg	-20% ~ +10% (80~110%)

* μg/kg = ng/g = ppb (マイクログラム/キログラム = ナノグラム/グラム = 10 億分の 1)

2.1.4. 精度 Precision

分析法の精度は、規定された使用条件下で均質な試験物質から得られる相互に独立した試験結果間の一致の近さである。結果は、一般に、分析成分の様々な濃度における反復分析 (n = 6) のパーセント相対標準偏差で表される。異なる試験室間の分析の変動は再現性 (再現精度、reproducibility) と定義され、試験室内での繰り返し分析の変動は繰り返し性 (併行精度、repeatability) と定義される。単一試験室妥当性評価の精度には、ラン内 (繰り返し性、併行精度) 及びラン間の要素を含めるべきである。

分析法のラン内及びラン間の精度は、妥当性評価手順の一部として測定することができる。分析法を開発している試験室は、多くの場合、残留試験の試料を分析する試験室と同じであることが多いため、通常、残留減衰試験を実施するために再現性 (室間精度) を測定する必要はない。分析法の再現性を確立する代わりに、ラン内精度を測定することができる。ラン内及びラン間の精度は、3 日間の分析において、意図された妥当性評価範囲 (定量限界を含むべきである) を代表する異なる 3 濃度で、最低 3 回の反復分析を評価することにより決定すべきである。

残留分析法の妥当性評価に関しては、許容可能な変動は分析成分の濃度に依存する。精度は、表 2 に示す範囲を満たすべきである。

表 2: 分析成分の濃度と許容可能なラン内及びラン間精度

分析成分の濃度	ラン内精度 (併行精度) の許容される変動係数 (CV)	ラン間精度の許容される CV
< 1 μg/kg	30%	45%
≥ 1 μg/kg 及び < 10 μg/kg	25%	32%
≥ 10 μg/kg 及び < 100 μg/kg	15%	23%
≥ 100 μg/kg	10%	16%

2.1.5. 検出限界 Limit of detection

検出限界 (LOD) は、許容される確かさをもって試験試料中の分析成分の存在を推定することができる分析成分の最小測定濃度である。LOD を決定する科学的に妥当な方法がいくつかある。検出限界を決定するための APVMA の好ましい方法は、国際純正・応用化学連合 (IUPAC) により用いられている定義であり、LOD は、20 対照試料 (少なくとも 6 つの別々の供給源) の分析結果の平均値 + 平均値の標準偏差の 3 倍として推定される。

2.1.6. 定量限界 Limit of quantitation

定量限界 (LOQ) は、規定された真度及び精度で測定することができる分析成分の最小測定濃度である。LOD と同様に、LOQ を決定する科学的に妥当な方法がいくつかある。

LOQ を決定するための APVMA の好ましい方法もまた、IUPAC の定義であり、LOQ は、20 対照試料 (少なくとも 6 つの別々の供給源) の分析結果の平均値 + 平均値の標準偏差の 10 倍として推定される。

推定された LOQ で真度及び精度の試験を行うことは、LOQ の決定に関する確定的な証拠を提供する。当該濃度での繰り返し性 (併行精度) 測定における変動係数が、真度及び精度の許容範囲 (上記参照) 以下であれば、推定された LOQ は許容される。

主要輸入国が対象とする動物用医薬品の輸入基準や許容量を定めていない場合、LOQ が輸出向けと畜保留期間を決定するための達成目標指標となることが多いため、分析法の「真の」LOD 及び LOQ の決定に特に重点が置かれる。ある動物用医薬品が「禁止物質」に分類されている場合、どのような検出であっても違反となる可能性があるため、監視試験を LOD の濃度まで実施することがある。

2.1.7. 選択性又は特異性 Selectivity or specificity

選択性は、測定される分析成分と分析される試料中に存在すると考えられる他の物質とを識別する分析法の能力である。選択性に関する詳細は、記載された測定原理が使用される場合に、存在する可能性が有り、信号を与える物質 (例えば対象となる残留物質の同族体、類似体、代謝産物) に関連するものであることが望ましい。残留減衰試験で使用される分析法では、選択性は、主に測定される試料中の内因性物質に対して定義される。残留減衰試験は十分に管理されているため、外部から投与される成分 (すなわち、他の動物用医薬品又はワクチン) は、既知のものであるか又は試験中の使用が認められない可能性がある。特異性に関する詳細から、実験条件下において当該分析法が分析成分と他の物質とを識別できる程度を判定できるようにすべきである。

2.1.8. マトリックス中での安定性 Stability in matrix

残留減衰試験で採取した試料 (組織、乳、卵又ははちみつ) は、通常、分析が行われるまで凍結保存される。これらの試料を、提案された保存条件下で、分析前に過剰な分解を伴わずにどのくらい保存できるかを決定することが重要である。妥当性評価手順の一部又は別の試験として、適切な保存条件 (例えば 4 °C、-20 °C 又は -70 °C) 及び分析までの試料の保存期間を決定するために安定性試験を行うべきである。

試料は既知量の分析成分を添加し、適切な条件下で保存する必要がある。保存した検体を規定された期間 (例えば、開始時、1 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後) で定期的に分析する必要がある。試料を凍結している場合は、凍結・融解試験 (3 回の凍結・融解サイクルを最低でも 1 日 1 回) を実施すべきである。あるいは、開始濃度を決定するために実施された最初の分析で用いた実残留試料を使用してもよい。マトリックス中の安定性評価の推奨される手順は、妥当性評価範囲の上限及び下限付近の異なる 2 濃度で 3 回繰り返し分析を行うことである。

マトリックス中の安定性は、規定された安定期間のある時点で得られた平均濃度が、「真度」の項で設定された真度の許容基準内で、開始時の分析結果又は新たに添加した対照試料の分析結果と一致する場合に許容されるとみなされる。

2.1.9. 保存安定性試験の実施 Conduct of storage stability trials

残留分析のために採取した試料は、物理的及び化学的变化が起こる前に、採取後できる限り速やかに分析すべきである。試料を非常に長期間(6ヵ月以上)保存する場合、用いる保存条件の間、残留物の安定性に関する説明又はデータを提供すべきである。

試料中の残留物の安定性に関する検討は、代表的な基質(substrates)を用いて、保存温度で経時的に実施すべきである。安定性試験は、提案された残留試験の規模と同様の試料調製手順及び保存条件で保存された試料を用いて実施すべきである。しかし、保存安定性試験に用いられる試料は、有姿の状態ではなくホモジネートとして保存することができる。ホモジネートは、均質化の過程で動物用医薬品やその代謝物と反応する酵素、酸及び他の化学物質を放出する可能性があるため、最悪の状態を代表する。このような条件下で残留物が分解すると、容認できない結果になる可能性がある。

実残留物を含有する調製された試料で実験を行うことができる。あるいは、通常の保存条件下に置かれる前に、調製された対照試料を分割して、既知量の薬剤を添加してもよい。

保存中に代謝物(残留の定義に含まれる)に分解する可能性が高い場合、親化合物に関する試験に加え、代謝物を添加した試料について安定性試験を実施することが望ましい。

2.1.10. 処理試料の安定性 Process sample stability

試験試料は、1日目に処理され2日目に分析されたり、又は機器の故障のためにさらに何日か、例えば週末にかけて保存されることがよくある。処理試料の保存条件下での安定性を判断するために、必要に応じて処理試料抽出液中での分析成分の安定性を検討することがある。保存条件の例としては、室温で4~24時間及び4°Cで48時間保存などがある。分析法の要件に従い他の保存条件を検討することもある。処理試料の安定性を評価するためのプロトコルは、妥当性評価範囲の上限及び下限濃度付近の異なる2濃度で3回反復分析を行うことが推奨される。処理試料の安定性は、規定された安定性測定時点で得られた平均濃度が、最初の分析結果又は新たに添加して処理された対照試料の分析結果と、「真度」の項において設定された真度の許容基準内で一致すれば適切であると考えられる。

2.1.11. 頑健性 Robustness

頑健性は、特に時間の経過とともに変更や修正を受けると考えられる分析法の条件について評価すべきである。これらの条件には、試薬ロット、インキュベーション温度、抽出溶媒の組成及び容量、抽出時間及び抽出回数、固相抽出カートリッジのブランド及びロット、分析カラムのブランド及びロット、及び高速液体クロマトグラフィーの溶出溶媒の組成などが含まれる。測定法の開発、妥当性評価又は使用中に、これらの条件の一部又はすべてに対する分析法の感度を明らかにすることができる、そのため分析法の性能に最も影響を与える可能性がある条件の変動について評価することが望ましい。

最終更新日:2014年7月1日

最終校閲日:2014年7月1日

URL: <https://apvma.gov.au/node/723>

バージョン: 1

資料⑤: Guidelines for the Design and
Implementation of National Regulatory Food
Safety Assurance Programme Associated with the
Use of Veterinary Drugs in Food Producing
Animals CAC/GL 71-2009

食品生産動物における動物用医薬品の使用に関連する 国家規制食品安全保証プログラムの設計及び実施に関 するガイドライン CAC/GL 71-2009

〔「残留規制のための分析法(134～195 項)」の部分を抜粋〕

本文書は、2009年にコーデックス委員会で採択されたガイドラインである。また、原文は下記のタイトルで、英語で公表されたものである。

Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programme Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals CAC/GL 71-2009

<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に応じ原文を参照ください。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます。

食品生産動物における動物用医薬品の使用に関連する国家規制食品安全保証プログラムの設計 及び実施に関するガイドライン

CAC/GL 71-2009

目次

項

緒言	1-5
適用範囲	6
一般原則	7-12
リスクに基づくアプローチ	13-20
定義(本ガイドラインに適用)	
規制の枠組み	
役割	21-23
管轄当局による承認	24-29
動物用医薬品に関する情報	30
販売及び使用	31-36
事業者の責任(ベストプラクティスガイダンス)	37-46
検証プログラム	
目的	47-49
一般設計原則	50-52
システム及び標的検証プログラムの設計	53
リスクプロファイリング	54-62
検証プログラムの選定	
システム検証プログラム	63-67
リスク標的検証プログラム	68-69
調査	70
レビュー	71-72
試料採取	
一般原則	73-74
トレーサビリティ/製品追跡	75-77
統計学的検討	
概論	78-87
試験室分析中のコンサイメントの保持	88
結果の解釈	89-91
入港検査プログラム(特別要件)	92-109
規制措置	
不適合の調査	110-113
不適合時の対策: 実施	114-119
不適合時の対策: 製品	120-124
不適合時の是正措置	125-129
2管轄当局間の管理プログラムの相互関係	130-133

[抜粋部分: 134~195]

残留規制のための分析法

残留規制のための分析法の一般検討事項

緒言	134-136
残留規制に関する分析法の統合	137-143
分析法の選択及び妥当性評価のための考慮事項	
分析法の要求事項の特定	144-146
他のコーデックス委員会ガイドラインの実施	147-148
分析法妥当性評価及び目的適合性	149-154
単一試験室妥当性評価-クライテリアアプローチ	155-156
食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の属性	

緒言	157
分析法の開発における検討事項	158-159
分析性能特性	
スクリーニング分析法の性能特性	160-163
定量分析法の性能特性	164-174
確認分析法の性能特性	175-181
規制管理プログラムで用いられる分析法の一般性能特性	182-185
残留規制分析法に関する分析法の開発及び妥当性評価の検討事項	
妥当性評価のための適切な検体の選択	186-189
測定不確かさ	190
内標準の使用	191
分析環境に関する検討事項	192
妥当性評価モデルの選択	193-194
品質管理システム	195
付録 A – サンプルング手法	
無作為サンプルング	
目的	1
サンプルング母集団サイズに関する統計学的検討事項	2-6
サンプルングの信頼性報告	7-10
管理又は標的サンプルング	
目的	11-13
付録 B – 個別食品のサンプルング	
適用範囲	1
定義	
サンプルング手順	2-9
はちみつに関する特別な試料製整法	10
統計学的検討事項	11
層別無作為サンプルング	12-15
系統サンプルング	16-17
偏りのあるサンプルング又は最悪の場合を想定したサンプルング	18-19
試験室試料の調製	20-22
試験室試料の送付	23
試験室における結果の解釈	24-25
サンプルングの記録	26-27
さまざまな個別食品の試料の種類及び量に関するガイダンス	
表 A: 食肉及び家禽肉製品	
表 B: 乳、卵、乳製品	
表 C: 水産製品	

残留規制のための分析法

残留規制のための分析法の一般検討事項

緒言

134. 動物用医薬品の最大残留基準値 (maximum residue limit for veterinary drugs : MRLVD) の遵守を判定するために用いられる分析法は、動物用医薬品として使用される可能性のある動物用医薬品及び物質のすべての残留物の検査プログラムにおいて、加盟国の管轄当局による日常的な使用にふさわしいものであることが望ましい。これには、家畜への用途があり、食品中に残留物として存在する可能性がある特定の農薬が含まれる。これらの分析法は、設定された MRLVD の遵守を判定するための国の規制管理プログラムにおける無作為に選択された調査試料の分析、MRLVD への不適合が疑われる場合の標的試料の分析、又は摂取量推定に使用されるデータの収集に用いられる。

135. 分析法は、コーデックス委員会により ADI や MRLVD が設定されていない物質の残留物を検出するための規制管理プログラムにも必要とされる場合がある。物質によっては、毒性学的評価により、ADI 又は MRLVD を設定すべきでないとの結論が導かれる。このような物質については、残留を検出可能な最低濃度及び食品中での同定の確認が分析法妥当性評価における主な関心事項である。残留物としての物質の存在の検出及び確認が主な問題となるこのような物質にとっては、定量分析に関連する性能特性は、あまり重要ではないかもしれない。残留物の同定の確認は、一般に、検出された物質の一連の特性を、疑わしい残留物の既知の標準物質と比較することに基づいている。

136. 残留動物用医薬品と食品の考えられるすべての組み合わせに対して、妥当性評価された分析法が、常に利用できるわけではない。国の残留規制プログラムの設計に責任を有する管轄当局は、コーデックス MRLVD の遵守を保証するため、適切な残留分析法が用いられるようにすべきである。このためには時に新たな分析法の開発及び妥当性評価、又は既存の分析法の妥当性評価を拡大して、分析成分とマトリックスの新たな組み合わせを盛り込む必要がある。その後、分析データの信頼性に従い、不適合製品に対して適切な規制措置を講じる場合がある。

残留規制に関する分析法の統合

137. 食品中の残留動物用医薬品に関する分析法は、対象とする分析成分を確実に検出し、その濃度を定量し、そして分析成分を正確に同定しなくてはならない。承認された動物用医薬品の使用に起因する残留物が、設定された MRLVD を超える濃度で検出された場合、規制施行措置を取る前に結果を確認すべきである。管轄当局によって食品生産動物への使用が禁止されている物質の場合、又は毒性上の理由により ADI 及び MRLVD が設定されていない物質の場合、食品中の濃度に関係なく存在が確認されたなら規制措置の対象となる可能性がある。

138. 残留規制プログラムに使用される分析法の主な性能属性は、分析法が単に対象残留物の存在を検出するか、定量するか又は確認するかを目的としているかどうかに依存している。分析法の承認がこれら 3 つのカテゴリーの 1 つについてであれば、完全な試験室間共同試験²は要求されない。

139. スクリーニング分析法は、その性質上、定性又は準定量的であり、MRLVD 又は管轄当局により設定された他の規制値を超える残留物を含有する可能性のある一群の動物又はロットから採取された試料の存在 (又は不在) を特定するスクリーニング分析法として用いられる。これらの分析法は、存在する濃度の正確な測定や残留物の構造確認を行うものではないが、どの物質についてさらに検査すべきか、又はどれが免除可能かを迅速に判断するために用いられる。これらの分析法は、試料中に規制値を超える残留物が含まれているかどうかを決定するために、フードチェーンに入る時点、検査施設又は試験室での試料の受領時に適用される。このような分析法は、通常、より高い分析効率を提供し、非試験室環境で実施できる場合があり、規制管理プログラムでの使用においては、試験室内で行われる検査よりも安価と考えられる。スクリーニング分析法を使用することにより、この試験を用いて同定された推定陽性 (疑い) 試料の分析に、試験室資源を集中することが可能となる。これらの分析法 (規定された低い偽陰性率を有すべきである) は、MRLVD に適合していない可能性があるとして特定された試料に適用するために、適切に妥当性評価された定量分析法及び/又は確認分析法がないのであれば、公的な試料に関する残留規制目的では、単独で使用すべきではない。

140. 定量分析法は、ある試料中の残留物が MRLVD 又は他の規制値超過の決定に用いられる定量的情報が得られるが、残留物の同定の明確な確認をすることはできない。このような定量結果を得る分析法は、MRLVD 又は規制措置限界を挟む分析範囲内において良好な統計管理がなされていなければならない。

141. 確認分析法は、残留物の同定の明確な確認を提供し、またその含有量を確認することもできる。確認分析法は最も決定的な分析であり、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC/MS) などのクロマトグラフィー法及び質量分析法に基づくことが多い。残留物の同定確認に用いられる場合、このような分析法は設定された統計的限界の範囲内で確実な構造情報を示すべきである。確認分析法により定量的情報が得られない場合、元の定量分析法又は適切に妥当性評価された代替の定量分析法を用いて、複製試験試料を分析することにより、元の定量分析法の定量結果を検証すべきである。

142. これらの 3 つのカテゴリーの分析法 (スクリーニング、定量、及び確認分析法) は、多くの場合いくつかの性能特性を共有する。さらに、各カテゴリーには特定の考慮すべき事項がある。これら 3 つのカテゴリーの分析法間の関係を理解することが、バランスのとれた残留規制プログラムの開発及び実施には重要である。残留規制プログラムでは、これら 3 つのカテゴリーの分析法が連続して用いられる可能性がある。

² Horwitz, W. 1995. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure and Applied Chemistry*, **67**:331-343.

143. スクリーニング分析法で「陽性」の試料は疑わしいとみなされ、通常、さらに確定的な分析法を用いた試験室検査に供される。これにはスクリーニング分析法による複製試験試料の反復試験が含まれる場合があるが、一般的には、試料が規制値を超えた残留物を含有していることを確定するために、試験室において定量分析及び/又は確認分析法が用いられる。このような試験は、最初の試験で検出された分析成分が確実に疑わしい化合物であり、MRLVD(又は当局が設定した他の規制値)を確実に超過していることを確認するために、最初のスクリーニング分析法で用いた試料からの新たな試験部分について実施されるべきである。各分析法のタイプ(スクリーニング、定量及び確認分析法)に関する分析法妥当性評価において決定されなければならない性能属性又は特性は、後述する「食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の属性」の章に示されている。

分析法の選択及び妥当性評価のための考慮事項

分析法の要求事項の特定

分析法の適用範囲 Method scope

144. 分析法の意図された目的は、通常、分析成分(残留物)、マトリックス(組織、乳、はちみつなど)、及び当該分析法が適用される濃度範囲を規定した適用範囲 scope のステートメントで定義される。また、適用範囲では、分析法がスクリーニング、定量又は確認分析での使用を意図したものであるかどうかについても提示する。管轄当局は、MRLVD が設定されている各薬剤について、適切な指標残留 marker residue を設定しなければならず、また、試験のためにサンプリングするのに適した標的組織についても指定すべきである。

指標残留 Marker residue

145. MRLVD は、指標残留によって表され、指標残留には親薬剤、主要代謝物、親薬剤及び/又は代謝物の合計又は分析中に残留薬剤から形成される反応生成物が考えられる。時として、親薬剤又は代謝物は結合残留物の形で存在する場合があります。分析のために化学的処理又は酵素処理により遊離する必要がある。可能な限り、指標残留は、薬剤に暴露したという明確な証拠を示すことが重要である。稀に、薬剤への暴露以外の発生源から生じると考えられる化合物を指標残留に用いる必要があることもある。このような場合、残留物の推定される発生源が薬剤への暴露であることを確認するために追加情報が必要となる。このような状況の一例に、薬剤ニトロフランの指標残留として、他の発生源から生じると考えられるセミカルバジドの使用がある。

標的組織 Target Tissue

146. 残留規制プログラムにおいて残留動物用医薬品を検査するために管轄当局によって選定された標的組織は、通常、最大濃度で指標残留が残留し、最も残留が持続する可食組織である。脂溶性物質の場合、通常の標的組織は脂肪である。他のほとんどの物質の場合、標的組織は、主要排出経路に基づき肝臓又は腎臓である。通常、これら組織のひとつが、動物由来の国内で生産される食品の試験で使用される標的組織に指定される。輸入製品の検査では臓器組織が入手できない可能性があるため、これらの食品の検査では筋肉組織が標的組織になると考えられる。通常、注射剤として投与される薬剤のような場合、注射部位と思われる筋肉組織の検査が必要となる場合がある。規制プログラム管理者及び試験室管理者は、適切な分析法が管理規制プログラムで確実に使用されるようにするために、試験の目的、及び標的組織、指標残留及び濃度範囲に関して要求される分析要求事項を明確にする必要がある。状況により、管轄当局は、対象とする残留物の有無を示すために尿や血清などの生物体液を使用することもできる。

他のコーデックス委員会ガイドラインの実施

147. コーデックス委員会は、食品の輸出入検査にかかわる試験室のためのガイドライン³を公表している。本ガイドラインでは、当該試験室に対して以下のことを推奨している。

- (a) 「分析化学試験室における内部精度管理に関する調和ガイドライン (Harmonised Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry laboratories⁴)」に記載されているような内部精度管理の手順の使用
- (b) 「(化学)分析試験室の技能試験に関する国際的な調和プロトコル (the International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories⁵)」に定められた要求事項に適合する食品分析の適切な技能試験プログラムへの参加
- (c) ISO/IEC ガイド 17025:2005「較正及び試験室の能力に関する一般要求事項 (General requirements for the competence of calibration and testing laboratories)」に定められた試験室のための一般基準の遵守
- (d) コーデックス委員会によって定められた原則に従って妥当性評価された分析法が利用可能な場合は、その分析法の使用

148. 食品中の残留動物用医薬品の分析に用いられる分析法は、残留規制プログラムに含まれる化合物を検出する能力を有すべきである。対象食品に関する分析法の回収率及び精度は、本文書に記載されている基準を満たすべきである。分析法は、上記で参照された、内部精度管理に関する文書における原則と一致する、確立された試験室の精度管理システム内で用いられるべきである。多施設性能試験を受けていない分析法が食品中の残留動物用医薬品を管理するための規制プログラムに用いられる場合、これらの分析法に適用される制度管理及び品質保証手順を慎重に規定、実施、及び監視する必要がある。多施設性能試験を経た分析法の場合、試験中に得た結果から回収率や精度などの性能特性が定義される。単一試験室内で妥当性評価された分析法については、当該試験室内の分析者によって使用される場合、分析法に期待される性能特性を定義するためのデータを生成しなければならない。継続中の性能は、試験室における適切な場所で、品質管理システムを通じて監視しなければならない。

³ CAC/GL 27-1997. 食品の輸出入規制に関わる試験室の能力評価に関するガイドライン (Guidelines for the Assessment of the Competence of Testing Laboratories Involved in the Import and Export Control of Food).

⁴ Pure and Applied Chemistry, **67** (1995): 649-666.

⁵ Pure and Applied Chemistry, **78** (2006) 145-196.

分析法の妥当性評価及び目的適合性

149. 分析法妥当性評価のプロセスは、分析法の目的適合性を実証することを目的としている。これは、適切に訓練された分析者が規定の装置及び材料を使用し、その分析法に定められた手順に従うことにより、試料の分析に関する規定の統計的境界内で信頼性のある一貫した結果が得られることを意味する。妥当性評価は、残留プログラム管理者と相談の上で、試験室によって特定される指標残留、標的組織及び濃度範囲の問題に対処すべきである。適切な分析標準物質を用いて分析法のプロトコルに従う場合、経験豊富な残留規制試験室において訓練された分析者により、同一又は同等の試料材料に関して、規定の性能境界内の結果が得られるべきである。

150. 多施設分析法性能試験は、通常、規制プログラムで使用するための分析の要求事項を満たす。これらの分析法は、独立した試験室における分析者による適切に設計された試験室間試験に供され、参加試験室によって異なる供給源の試薬、材料及び装置が用いられる。

151. AOAC インターナショナル、国際純正・応用化学連合 (IUPAC) 及び国際標準化機構 (ISO) により 1995 年に採択された修正調和プロトコルに従って共同試験が行われた定量分析法は、最低でも 8 試験室で評価されている。ただし、非常に複雑な装置や一般的ではない要件が特定される場合を除く(この場合、最低 5 試験室の参加が要求される)⁵。定量分析法の試験室間共同試験は、現在、最低 10 試験室の参加が必要である。1995 年以前に実施された試験室間共同試験は、統計的に設計された許容可能な試験において、最低 6 試験室で分析法の評価が完了した。これらの多施設分析法性能試験は、異なる試験室における異なる分析者によって実施される分析法の性能に関する情報が得られることから、通常、規制プログラムで使用するための分析の要求事項を満たす。しかしながら、食品中の動物用医薬品に関する残留規制プログラムに現在用いられている分析法については、このような多施設試験によって妥当性評価された分析法は比較的少ない。試験室間共同試験の試験デザインは、分析法の適用範囲に含まれる分析成分、マトリックス及び濃度の組み合わせを代表する、コード化されたデュプリケート検体の分析に基づき、試験デザインと結果の両方に関する独立したピアレビューを含む。場合により、最低試験室数が試験室間共同試験としての基準に満たないまま多施設試験が行われることがある。このような試験が、試験室間共同試験に適用されるのと同じ設計、評価及び審査の科学的原則を用いて実施される場合、異なる試験室における複数の分析者による分析法の性能に関する有用な情報を得ることが可能であるが、試験室間共同試験の結果から得られるのと同じ統計的信頼度は得られない。

152. 分析法の多施設試験及び試験室間共同試験は、通常、試験に続いて当該分析法が適用される可能性のある残留物、組織及び動物種について考え得るすべての組み合わせを網羅しているわけではない。分析法は、関連する分析成分、追加の組織、動物種又は製品(又は元の多施設試験に含まれていないこれらの組み合わせ)を含むように、追加の試験室内試験を行うことにより拡張することができる。分析法拡張試験で得られた分析結果は、規制プログラムで使用する前に追加の審査を要求されることがある。通常の試験室間共同試験で妥当性評価されていない分析法を用いて得られた分析結果は、可能な限り、試験室間共同試験又は多施設試験により妥当性評価された分析法、又は認証された技能プログラムからの試料を用いて試験された分析法により得られた結果と比較すべきである。この比較は、同じ(均一)試料の部分を使用して、統計的に許容可能な試験デザインに基づいて行われるべきである。このような試験で得られたデータは、分析法の性能の比較可能性を判断するために、適格な第三者(QA 部門、規制科学者のピアレビューグループ、国家認証組織の監査員など)により独立した審査を受けるべきである。

153. MRLVD の遵守を判定するのに適切であることが実証されているいくつかの残留規制分析法は、1 施設以上の実績がある試験室で使用されている経歴はあるが、正式な多施設試験に供されていない。これらの分析法は、最初の規制使用時において適切であることが実証されたものであり、妥当性評価された代替となる分析法がない、又は国家プログラムの制約内での使用において使用可能な技術、費用、信頼性及び適合性などの理由から依然として望ましい選択であることにより、長期にわたりその使用が継続されている。正式な共同又は多施設分析法試験による証拠は欠けているものの、当該分析法の性能は、経時的な 1 施設以上の試験室におけるその成功している使用及び精度管理データにより実証されている。

154. 規制試験室のほとんどは、多施設試験を受けていない動物用医薬品残留分析法の使用に頼っている。このような状況は、専門化している専門的技術や装置に関する要件、当該試験の費用、適切な共同試験室の不足、分析成分及び/又は試料の不安定性、及び急速に変化する技術などの要因が影響している。長年にわたり、分析結果の同等性に重点を置いた取り組みは、試験室間共同試験により規定された性能特性を有する標準化された分析法の使用に基づいていたが、現在、認証試験室は、使用された分析法及び生成された分析結果が、依頼主と協議して設定した性能基準を満たすことを実証することが個々の試験室の責任であるという状況下で業務を行っている。試験室間分析法試験により妥当性評価された分析法がない場合、規制試験室は、分析法の性能を特徴づけるために、自身の試験室内で実施した試験の対象とされた分析法を頻繁に使用しなくてはならない。

単一試験室妥当性評価 – クライテリアアプローチ

155. IUPAC により技術報告書として、単一試験室における分析法の妥当性評価に関するガイダンス文書、「単一試験室における分析法の妥当性評価に関する調和ガイドライン (Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis)⁶」が発行されている。手続きマニュアル (Procedural Manual)⁷ では、試験室間で妥当性評価された分析法は、特に多成分/多基質分析法及び新規分析成分については、必ずしも使用可能又は適合可能でないと認識されている。そのような場合、分析法の選択に関する一般基準ならびに以下に示す追加の基準を満たすために、単一試験室で分析法の妥当性評価をする場合がある。

- (a) 分析法は、国際的に認められたプロトコル(例えば、上記で参照した単一試験室における分析法の妥当性評価)に関する IUPAC ガイドラインなどに従い妥当性評価される。

⁶ Thompson, M., Ellison, S.L.R. & Wood, R. (2002) Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure and Applied Chemistry* 74: 835-855.

⁷ FAO/WHO コーデックス委員会手続きマニュアル (Procedural Manual)

- (b) 分析法の使用を、ISO/IEC 17025 (2005) 規格又は GLP 原則 (Principles of Good Laboratory Practice) に準拠した品質管理システムに組み込む。
- (c) 分析法は、以下の例によって示された精確さに関する情報によって補完されるべきである。
- ・ 可能であれば、定期的な技能試験への参加
 - ・ 適用可能な場合、認証標準物質による校正
 - ・ 分析成分の予測濃度で実施された回収試験
 - ・ 可能であれば、他の妥当性評価された分析法による結果の検証

156. 単一試験室妥当性評価モデルと分析法が特定の性能規格を満たすという要件を組み合わせたクライテリアアプローチは、いくつかの規制当局で採用されている。

食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の属性

緒言

157. MRLVD の遵守の判定に用いられる分析法の性能特性を規定し、それに従い提案された分析法を評価しなくてはならない。これにより、信頼性の高い分析結果が保証され、国際貿易における食品中の残留動物用医薬品の判定が確かなものとなる。上記の「残留規制のための分析法の一般検討事項」の章では、規制分析法の一般的な種類又はカテゴリーに関する議論を示し、規制の枠組みの中で意図する目的に基づいた分析法の体系を提供している。以下の議論では、コーデックス MRLVD への準拠を判定するための 3 つのカテゴリーの分析法(確認分析法、定量分析法及びスクリーニング分析法と呼ばれる)に共通する属性を示す。分析法の 1 つ又は 2 つのカテゴリーのみに適用可能な追加の属性についても述べる。

分析法の開発における検討事項

158. 分析法の開発には、用いられる分析技術に熟練した分析者、ならびに適切な試験室空間、装置及び経済的支援を必要とする。分析法の開発を開始する前に、要求される性能パラメータを含む、残留規制プログラムにおける分析法の使用目的及び必要性を設定すべきである。他の検討事項には、分析法の要求される適用範囲(対象とする化合物又は化合物の種類及び試料の種類)、予測される干渉物質、測定系に要求される性能特性、分析法の性能に影響すると考えられる関連する物理化学特性、望ましい試験系の特異性及びその判定方法、分析成分及び試薬の安定性データ並びに試薬の純度、分析法の性能因子を満たすために許容される操作条件、試料調製ガイドライン、分析法の性能に影響する可能性のある環境要因、安全上の配慮事項、及びプログラムのニーズに関連するその他の特定の情報などがある。特に、通常の保存及び使用条件下並びに試料処理中の両方の条件における標準物質の安定性を評価すべきである。確認を目的とした再分析の可能性に備えて保留されている期間を含む、分析前の試料の一般的な保存条件における試料中の分析成分の安定性についても決定すべきである。

159. 分析法の性能属性を確立することは、公衆衛生プログラムの策定及び管理に必要な情報を食品安全に関する機関に提供するという点で不可欠である。また、分析法の性能属性は、将来の計画、評価及び製品の処理において良好な管理の決定根拠ともなる。動物医療業界にとっては、分析手順の開発において達成しなくてはならない性能を正確に知るためのガイドラインとなる。十分に規定された分析法の性能因子を有することは、全関係者に有益なものとなる。分析法の性能要件は、最大残留基準値が設定されている残留物のスクリーニング、定量又は確認に使用される分析法か、あるいは ADI 及び MRLVD が提案されていない残留薬剤の分析法かによって異なる。後者の場合、管轄当局は、規制管理目的で使用される分析法が満たさなくてはならない最低性能基準を設定することができる。しかしながら、これらの化合物の食品中の安全な濃度が設定されていない場合、管轄当局は、技術及び分析能力の向上が反映されていることを確認するために、そのような基準を定期的に見直すことができる。このような基準が管轄当局によって正式に設定されていない場合、通常は規制試験室で用いられる分析法の検出能によって事実上設定される。

分析性能特性

スクリーニング分析法の性能特性

160. スクリーニング分析法は、通常、その性質上定性的又は準定量的であり、閾値を超える検出可能な残留物が含まれていない(「陰性」)試料と閾値を超える残留物を含む(「陽性」)試料を区別することを目的としている。従って、妥当性評価の方針は、結果が「陽性」となる閾値濃度の設定、統計学に基づいた結果の「偽陽性」率及び「偽陰性」率の決定、干渉に関する試験及び適切な使用条件の設定に重点が置かれる。

161. 特に検査キットを用いるスクリーニング検査において、「感度(sensitivity)」という用語は、分析対象物が規定の統計的境界内で確実に検出される最低濃度をいう。検査キットに関する AOAC 性能検査プログラム(AOAC Performance Tested Program)では、感度は、標的濃度で分析成分を添加した最低 30 の残留のない試料を試験することにより実験的に決定される。試料は最低 6 つの異なる供給源(即ち、少なくとも 6 つの供給源の各々から少なくとも 5 つの反復試料)から採取されるべきであり、これらの試料は標的濃度で添加したときにすべて陽性結果となるべきである。3 つ以上の陰性結果を生じた場合は、感度検査に不合格となる。1 つ又は 2 つの陰性結果を生じた場合は、実験を繰り返す必要があり、その結果陰性結果が 2 つであれば不合格となる。実験は、既知の実残留試料が入手可能であればこれを用いて標的濃度で繰り返し行うべきである。

162. スクリーニング分析法の「選択性(selectivity)」とは、陰性応答を与える試料が真に陰性であることを判定する試験能力をいう。また、試験は、標的化合物又は化合物群の存在を、試料中存在すると考えられる他の物質と区別できなくてはならない。スクリーニング分析法は、化合物グループ又は種類に共通の構造的特徴を利用することが多いため、通常、その選択性は定量分析法ほど良好ではない。一般にスクリーニング分析法のカテゴリーに適合するこれらの分析法は、化合物を明確に同定しないような微生物の生育阻害、免疫測定、又は発色反応に基づくものが多い。スクリーニング分析法の選択性は、クロマトグラフィー又は他の分離手法の後に検出系を用いることにより増大させることができる。95%信頼水準(スクリーニング試験に推奨される)で少なくとも90%の選択率を実証するために、最低6つの異なる供給源からの代表的ブランク試料マトリックスについて、30回の反復分析を実施する。すべての結果は、陰性となるべきである。その後、予想される干渉及び交差反応について、予想される干渉物質(動物に投与される可能性のある他の薬剤、予想される環境汚染物質、薬剤の代謝物、又は化学的関連のある化合物など)を添加したブランクマトリックス物質を試験することにより追加試験を行うことができる。これら化合物が、試料中に合理的に予想される濃度で存在するとき、応答はやはり陰性となるべきである。

163. 特定の化合物に対する試験の「カットオフ値」又は閾値は、濃度を漸増して、各濃度で添加した、通常、30個の複製試料(少なくとも6つの供給源からの)を用いた濃度-応答実験により設定する。30個の複製試料のすべてが陰性応答を示す濃度及び30個の複製試料のすべてが陽性応答を示す濃度が確定したならば、「すべて陰性」の濃度と「すべて陽性」の濃度の間の均等な間隔の4濃度で添加したブランクマトリックス物質を用いて実験を繰り返す。追加のセットは、「すべて陽性」の濃度より20%高い濃度で試験を行う。結果の統計解析により、使用者は必要な信頼水準(通常95%)⁸で信頼できる検出濃度(detection concentration)を設定することが可能となる。

定量分析法の性能特性

164. 選択性 Selectivity (化合物からのシグナル応答を、試料中に存在し得る他の化合物の存在下で検出し区別する分析法の能力)は、食品中の残留動物用医薬品に関する規制管理プログラムで用いられる分析法の性能特性を定義する際に特に重要である。これには考慮しなくてはならない2つの側面がある - 即ち、試料中又は試料抽出物中に存在し得る他の化合物の干渉を受けずにシグナル応答を示す分析法の能力、及び特定の化合物だけに関連するものとしてシグナル応答を確実に同定する分析法の能力である。定量分析法に対しては、定量に用いたシグナルは、対象とする分析成分のみに関連し、共抽出物質に関する寄与が含まれていないことが要求される。完全に分離していないピークに基づくクロマトグラフィー分析は、信頼性の低い定量結果を示す。特定の化合物又は構造により特異的な元素特異的検出器や検出波長又は質量選択検出器の使用は、クロマトグラフィー分離と組み合わせることにより、食品中の残留動物用医薬品に関する定量分析法の選択性は向上する。

165. 分析法の選択性に加え、信頼性のある定量結果を与える分析法の能力を実証しなくてはならない。これは2つの要素からなる。

- 試料中に存在する分析成分の濃度に関して、真値又は許容される値に対する結果の近さ。(精確さ accuracy、真度 trueness、又はバイアス bias として表される。)及び
- 反復測定において一貫した結果を与える分析法の能力。[精度 precision (併行精度 repeatability 及び再現精度 reproducibility) として表される。]

166. コーデックス MRLVD をサポートするために用いられる分析法は、表1に示す真度及び精度に関する性能基準を満たすことが推奨される。表中、CV_Aは、抽出前に添加されたブランクマトリックスの試験試料によって決定される変動係数を表し、CV_Lは試料処理のばらつきに関する10%の推定値を加味した試験室全体の変動係数を表す⁹。

表1. 食品中の残留動物用医薬品の MRLVD をサポートするための定量分析法としての使用に適した分析法が満たすべき性能基準¹⁰

濃度 µg/kg	変動係数 Coefficient of Variability (CV)				真度 Trueness
	併行精度 (試験室内、CV _A) %	併行精度 (試験室内、CV _L) %	再現精度 (試験室間、CV _A) %	再現精度 (試験室間、CV _L) %	平均回収率% の範囲
≤1	35	36	53	54	50 - 120
1 ~ 10	30	32	45	46	60 - 120
10 ~ 100	20	22	32	34	70 - 120
100 ~ 1000	15	18	23	25	70 - 110
≥1000	10	14	16	19	70 - 110

⁸ Finney, D.J. (1978) *Statistical Method in Biological Assay*, 3rd edition. MacMillan Publishing Co., New York.

⁹ Fajgelj A., Ambrus A., eds. (2000) *Principles of Method Validation*, Royal Society of Chemistry, Cambridge UK.

¹⁰ CAC/GL 37-2001 分析法の回収率データの使用に関する IUPAC 調和ガイドライン (*Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement*)、Thompson, M., Ellison, S., Fajgelj, A., Willetts, P., & Wood, R. (1999) *Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement*, *Pure Applied Chemistry*, **71**: 337-348 も参照のこと。

167. 分析法の**精確さ Accuracy**は、認証標準物質の分析により、又は性能パラメータがすでに厳密に確立されている他の分析法（一般に試験室間共同試験が行われた分析法）により得られた結果と比較することにより、あるいは認証標準物質や試験室間試験で妥当性評価された分析法がない場合は、既知のブランク試料に添加された分析成分の**回収率 recovery**を測定することによって、決定することができる。認証標準物質及び試験室間試験によって妥当性評価された分析法の両方とも使用できないことが多いので、回収率として精確さを決定することが、食品中の残留動物用医薬品に関する分析法の妥当性評価に頻繁に用いられる。測定値の精確さは、**系統誤差 systematic error**（分析法バイアス）及び分析成分の回収率（回収百分率として測定）と密接に関連する。分析法の精確さに関する要求事項は、試験結果を規制でどのように使用するかにより異なる。精確さは、**MRLVD** 付近の濃度又は規制措置のための目標濃度（一般的には、目標濃度の 0.5～2.0 倍の濃度）で、慎重に特徴づけを行い、規定の統計的信頼水準内で規制措置限度を超えることを決定することができる残留物を含有する試料に対してのみ、規制措置が講じられるようにすべきである。

168. **回収率 Recovery**は、通常、既知の濃度で試料に添加した後の実験的に測定した分析成分の百分率として表され、分析法の分析範囲をカバーする濃度で評価するべきである。回収率の解釈では、試料に添加された分析成分は、生物学的に生じた実残留試料の同じ分析成分（残留動物用医薬品）と同じ挙動を示さない可能性があることを認識する必要がある。多くの状況において、抽出される実残留物の量（収量又は回収率）は、存在する総実残留物量よりも少ない。これは抽出時の損失、残留物の細胞内結合、抱合体の存在、又は分析成分を添加したブランク組織を用いた回収実験では完全には再現されない他の要因によるものと思われる。比較的高濃度では、分析法の回収率は 100% に近づくことが予想される。より低濃度では、特に広範囲の抽出、分離及び濃縮操作を伴う分析法では、回収率はより低くなる可能性がある。観察される平均回収率に関係なく、必要に応じて信頼性のある補正を最終結果に対して行うことができるように、変動の少ない回収率が望ましい。回収率補正は、コーデックス委員会によって提供されるガイダンス¹⁰に従って行われるべきである。

169. **精度 Precision**は、同一試料からの測定試料についての反復測定間のばらつきを数値化したものであり、これもまた、試料中の残留物が **MRLVD** 又は他の規制措置限界を超えていると考えられる場合の判定において重要な検討事項である。分析法の精度は、通常、試験室内変動（併行精度）及び分析法が多施設試験にかいけられた時には試験室間変動（再現精度）で表される。単一試験室における分析法妥当性評価では、精度は、最低 6 つの異なる蓄積組織、異なる試薬バッチ、望ましくは異なる装置などを用い、望ましくは異なる分析者により異なる日に実施した実験から決定すべきである。分析法の精度は、通常、標準偏差として表される。別の有用な用語は、**相対標準偏差**又は**変動係数**（算術平均の絶対値で除した標準偏差）である。精度は 100 を乗じることによって百分率として報告されることがある。

170. 分析法を開発している試験室で得られる分析法のばらつきは、開発後に分析法を使用する別の試験室で得られるばらつきよりも通常小さい。分析法が開発された試験室で適切な性能基準を達成できないのであれば、他の試験室でそれよりもよくなることは期待できない。

171. 定量分析法は、通常、試料中の分析成分からの応答と、既知濃度の溶液中の分析成分の標準品からの応答との比較に基づいている。分析法の開発と妥当性評価では、最初に検量線を決定し、一連の濃度範囲わたる標準品に対する検出器応答を評価すべきである。これらの濃度（最低 5 濃度及びブランク）は、対象分析成分の全濃度範囲を網羅し、結果として生じる曲線（検量線）は、統計学的に表現されるべきである。しかしながら、較正サンプルに適切なブランク試料を含めることが推奨されるが、これは、定量結果を得るために、検量線の低濃度範囲への外挿が許容されることを意味するものではない。分析関数は、対象分析成分の範囲全体にわたって、様々な濃度で試料から回収される分析成分の応答を関係づける。特定の試料（マトリックス）中に **MRLVD** 又は規制値が設定されている分析成分については、応答は、一般に、既知のブランク試料及び **MRLVD** の上下の濃度範囲で添加されたブランク試料（6 つの異なる供給源のブランク物質の使用が推奨される）について測定される。

172. 分析関数の実験データは、また、各濃度での分析回収率の計算にも使用することができ、マトリックス共抽出物の存在によって分析成分の応答が分析成分の標準品と比較して変化する場合に特に重要である。**直線性 linearity**は、分析関数の実験から決定され、目標濃度を添加した試料の分析のために得られた検量線の統計的表現法である。直線性は、一般に、線形応答があると仮定し、データの線形回帰分析から決定される。既知の代表的なブランクマトリックス物質に目標値をはさむ適切な濃度範囲で標準品を添加して作成した検量線（分析関数）に基づいて定量を行うことが、食品中の残留動物用医薬品の分析法によくみられるようになっている。較正のためのこのような「組織検量線 tissue standard curve」の使用は、得られた分析結果に回収率補正が組み込まれている。

173. 特定の分析法を用いて分析成分の存在に関する確実な検出、定量、又は確認を行うことができる下限値を確立することも必要である。**検出限界 detection limit**は、実際的には、試料中の分析成分を同定可能な最低濃度として説明される。検出限界は、上述の分析関数実験で作成された検量線の線形回帰分析で得られた標準偏差 (S_{yx}) を用いて推定することができる¹¹。この手法を用いると、検出限界は、検量線の y 切片（正の値と仮定）+ 3 S_{yx} を使用して計算される。この手法は、検出限界の控えめな推定を与える。検出限界はまた、代表的な検体の測定により、ブランク中の分析成分の最小応答値にその標準偏差の 3 倍を加えることによっても推定が可能である。この手法を用いる場合は、ほとんど検出できないような応答が生じる濃度で検体に添加し、ブランクの標準偏差の近似値を得る必要があることが多い。

174. **定量限界 limit of quantification (LOQ)**は、**limit of quantification** 又は **quantification limit** とも呼ばれ、同じ実験で検量線の y 切片 + 10 S_{yx} により設定することができる。コーデックス委員会により設定された **MRLVD** をサポートするために使用される分析法の定量限界については、表 1 の精度及び精確さ（回収率）の基準を満たし、**MRLVD** と同じかその 1/2 以下が望ましい。しかしながら、分析法の定量限界が、**MRLVD** の遵守のためにモニターされた実際の濃度よりも低い場合、分析法の妥当性評価及びその後の適用は、最低較正濃度 **lowest calibrated level (LCL)** に基づくべきであり、この濃度は一般には **MRLVD** の 0.5 倍である。規制プログラムでの使用では、**MRLVD** 以下の濃度で残留物をモニタリングすることに関心がある残留物への暴露を推定するのに分析法が適用される場合、又は **ADI** や **MRLVD** が持たない物質について残留分析を行う場合は、検出限界及び定量限界が重要なパラメータとなる。**MRLVD** の遵守の監視のためには、**MRL** 濃度が確実に定量されることを実証する分析法に **LCL** を含めることが重要である。**MRLVD** をサポートするために使用される分析法の **LCL** は、**LOQ** より小さくするべきではない。コーデックスの手続きマニュアルでは、「クライテリアアプローチで用いられる用語 (Terms to be Used in the Criteria Approach)⁷」の項で定量限界に **determination limit** という用語を推奨している。

¹¹ Miller, J.C., & Miller, J.N. (1993) Statistics for Analytical Chemistry, 3rd Edition, Ellis Horwood Ltd., Chichester.

確認分析法の性能特性

175. 選択性 *Selectivity* は、特定の化合物のみに関係する単一の信号応答を明確に識別する分析法の能力であり、確認分析法のための第一の考慮事項である。フーリエ変換赤外分光法又は質量分析などの特定の機器技術は、明確な同定を提供するのに十分な選択性があると考えられる。確認分析法ではこれらの技術に基づくことが多い。

176. 一般に、規制分析法では、許容される性能基準を満たすためには、最低 4 同定ポイントが必要である。高分解能質量分析法に基づく分析法は、低分解能質量分析法を用いて得られるよりもより精密な質量測定により高い信頼性を与えると考えられている。低分解能 GCMS 及び LCMS に基づく確認分析法の性能要件については、近年国際的な専門組織により公表されており¹²、表 2 に示す。

表 2: 種々の質量分析法技術を用いた相対イオン強度(標準品に対する試料の値)の性能要件⁹

相対イオン強度 (ベースピークに対する%)	GC-MS (EI) (相対)	GC-MS (CI), GC-MS/MS LC-MS, LC-MS/MS (相対)
>50%	≤10%	≤20%
20% ~ 50%	≤15%	≤25%
10% ~ 20%	≤20%	≤30%

177. 低分解能質量分析法によって検出された各構造的に重要なイオンフラグメントに、それぞれ 1 同定ポイントが割り当てられる。「トリプル四重極」質量分析計などのタンデム型低分解能装置を使用する場合、スペクトロメーターの第一段階で単離される一次フラグメントから二次フラグメントが検出される。これらの構造的に重要なフラグメントが、分子に関連する主要フラグメント(親イオン又はプリカーサイオン)の断片化によって生成されるという事実は、より高い信頼性を与えるものであり、そのような娘イオン又はプロダクトイオンは 1.5 同定ポイントの値が割り当てられる。低分解能 MS/MS 装置が確認分析法で使用される場合、プリカーサイオンと 2 つプロダクトイオンの組合せは、4 同定ポイントが与えられる。

178. 高分解能はより、精密な質量の同定が可能であり、各フラグメントの元素組成の予測に使用される場合もあることから、高分解能質量分析計が確認分析法で使用される場合は、さらに高い信頼性が得られる。シングル高分解能質量分析計の場合、検出された各構造的に重要なフラグメントにつき 2 同定ポイントの値が与えられ、高分解能 MS/MS 実験で生成されたプロダクトイオンは、それぞれ 2.5 同定ポイントが与えられる。さらに、同様の構造の同重体化合物から生じた同じ質量のフラグメントの可能性を排除するために、少なくとも 1 つのイオン比についても測定しなければならない。

179. 他の手法は、それらを組み合わせて使用する場合、確認手法と同等の選択性を達成できる場合がある。例えば、同定は、以下のような方法の組み合わせにより検証が可能である。

- (a) 薄層クロマトグラフィー
- (b) 元素特異的ガスクロマトグラフィー及び付属する検出システム
- (c) 特徴的な誘導体形成に続いて追加クロマトグラフィー、又は
- (d) 極性の異なる複数のクロマトグラフィーシステムを用いた化合物に特異的な相対保持時間の測定

180. このような手順は、分析成分の指定された MRLVD において適用可能でなければならない。質量分析などの確認分析法を利用できない場合、試料中の特定の残留動物用医薬品の分析に関連する選択性の情報については、様々な情報源から見いだすことができる¹³。この情報は、分析法が測定された濃度で試料中の特定の化合物を検出したという結論に至る、すべての情報の体系的経過記録文書から得られる可能性がある。単一の測定又は分析では化合物の同定及び/又は含有量に関して望まれる明確な証明はできないと考えられるが、収集された情報を統合することにより、分析者がデータ及び他の入手可能な情報と一致する論理的結果に到達するため、誠意をもって努力したという証拠を提供する。確認分析法の基準を満たすのに適切と考えられる分析手法の例を表 3 にまとめる。

¹² Bethem, R., Boison, J.O., Gale, J., Heller, D., Lehotay, S., Loo, J., Musser, S., Price, P., and Stein, S. (2003) Establishing the Fitness for Purpose of Mass Spectrometric methods. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14**: 528-541.

¹³ Stephany, R.W. (2003). SPECLOG – The Specificity Log. CRD-9, 食品中の残留動物用医薬品に関するコーデックス委員会、第 14 回セッション、米国バージニア州アーリントン、3 月 4~7 日

表 3. ミシュコルツ協議(Miskolc Consultation)⁹で推奨された物質の確認分析に適した検出法の例

検出法	基準
LC 又は GC 及び質量分析	十分な数のフラグメントイオンが観察される場合
LC-DAD	UV スペクトルが特徴的な場合
LC-蛍光分析	他の手法との組み合わせで
2-D TLC-(分光光度法)	他の手法との組み合わせで
GC-ECD, NPD, FPD	2 つ以上の分離手法 ^a と組み合わせる場合のみ
誘導体化	第一選択の分析法ではなかった場合
LC-イムノグラム	他の手法との組み合わせで
LC-UV/VIS(単一波長)	他の手法との組み合わせで

^a他のクロマトグラフィーシステム(選択性の異なる固定相及び/又は移動相の適用)又は他の手法。

181. 確認分析法は、一般的に、機器による手法であるが、ある種類の動物用医薬品に対する暴露を特定する病理学的変化又は形態学的変化についての観察も、十分な感度及び精度があるのであれば確認分析法となり得る。

規制管理プログラムで用いられる分析法の一般性能特性

182. 食品中の残留動物用医薬品に関する規制管理プログラムでの使用に適した分析法の選択にあたっては、いくつかの追加の検討事項がある。分析法は、堅牢(頑健)で、費用対効果が高く、比較的複雑ではなく、移植性があり、かつ一連の試料を効率的に同時に取り扱うことができるものであるべきである。分析成分の安定性についても確立しなくてはならない。

183. 堅牢性 *Ruggedness* 試験は、臨界管理ポイントを決定するために標準的な要因計画手法¹⁴を用いて行うべきである。計画に含める一般的な要因には、試薬容量又は濃度、pH、インキュベーション又は反応時間及び温度、試薬の品質、及び試薬又はクロマトグラフィー材料の異なるバッチ又は供給源などの変動が含まれる。確認分析法の堅牢性試験は、当該分析法が以前に妥当性評価されている定量分析法と著しく異なる場合(当該分析法が定量分析法とは異なる抽出法や誘導体化手順を用いる場合)に要求される。

184. 費用対効果 *Cost-effectiveness* とは、地域の供給業者から必要な純度で容易に入手できる試薬や消耗品の使用、並びに部品やサービスも容易に入手できる装置の使用をいう。分析法の効率 *method efficiency* は、複数の試料を同時に分析できる場合に増大する。これにより、試料あたりに必要な分析時間が短縮され、試料セットが単一か大規模かにかかわらず、試料の分析には一定の固定費がかかることから、通常、試料あたりのコストが削減される。多数の試料を短時間又は決められた時間内に分析しなければならぬ場合、1つの分析バッチ内で複数の試料に対応する分析法の能力が重要である。移植性 *Portability* とは、確立された分析性能特性を失うことなく、ある場所から別の場所に移すことが可能であるという分析法の特性である。

185. 分析中の分析成分の安定性 *Analyte stability* は、規制管理プログラムで使用されるすべての分析法について処理から分析完了まで、及び試料が分析を待つ間の一般的な保管条件において、試料物質の存在下で標準物質及び分析成分の両方について確立しなければならない。保管中の安定性について選択された期間は、スクリーニング、定量及び確認分析法の使用を含む、必要なすべての分析のために試料が保管される場合、その予想される期間をカバーすべきである。保管試験は、問題や再分析の要請がある場合に備え、スクリーニング、定量及び確認分析法のすべてが完了し、結果が報告されると予想される期間にさらに 90 日間以上を延長した期間で実施するのが堅実である。

残留規制分析法に関する分析法の開発及び妥当性評価の検討事項

妥当性評価のための適切な検体の選択

186. 試験室は、規制試料の分析に使用する分析法が適切に妥当性評価されていることを実証しなくてはならない。伝統的に、分析法の性能特性を規定するための分析データを提供するには、多施設での分析法妥当性評価試験が望ましい方法とされてきた。しかしながら、完全な試験室間共同試験の実施に要求されるよりも少ない試験室数で行われる多施設共同試験や、可能であれば品質管理システム、独立した監査及び技能分析や参照物質分析によって裏付けられた分析法性能の厳格な室内評価に基づく単一試験室妥当性評価など他のモデルが開発されている。

187. 残留規制分析法の開発及び妥当性評価では、データは 3 種類の試料から得るべきである。未処理動物からの対照試料からは、分析バックグラウンド及びマトリックス干渉に関する情報が得られる。添加試料は、対照試料に既知量の分析成分を添加したもので、管理された条件下において分析法が対象分析成分を回収する能力に関する情報が得られる。組織は、食餌、飼育、性別及び品種の相違による変動をカバーするために、複数の供給源から得るべきである。最低 6 つの異なる供給源から試料を得ることが推奨される。

188. 場合によっては、規制管理試験室での使用に既知の薬剤が含まれていない試料を利用できないことがある。このような場合、同等試料を使用することができる。同等試料は、未知の供給源からの試験試料と同じマトリックス、又は試料マトリックスと密接に一致する既知の薬剤が含まれていない供給源からの異なるマトリックスのいずれかと考えられる。すべての場合において、残留規制試験室は、同等試料が薬剤の干渉を受けず、添加試料で十分な回収率を示すことを実証しなくてはならない。さらに、定量分析法又はスクリーニング分析法に未知の供給源からの試料を使用する場合、マトリックスに薬剤の残留が含まれていないことを証明するために第 2 の分析法を用いることが推奨される。同等試料の目的への適合性を実証するのは、残留管理試験室の責任である。

¹⁴Youden, W.J., & Steiner, E.H. (1975) AOAC 統計マニュアル (*Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*)、AOAC International, Gaithersburg, VA

189. 最後に、薬剤を投与された食品生産動物からの実残留組織 (biologically incurred tissue) の分析では、生物学的相互作用や残留対照試料を分析するとき生じる他の相互作用などの情報が得られる。

測定不確かさ

190. 試験室は、依頼主の要請に応じて、測定不確かさに関する情報又は各定量分析法で得られた定量結果に関する信頼性の陳述書を提供すべきである。測定不確かさの推定に関するガイダンスは、IUPACにより作成中であり、他の独立した科学機関¹⁵により公表されている。

内標準の使用

191. 残留分析法は、分析管理のための内標準を用いて設計されることがある。内標準を正しく使用することにより、分析変動の一部が補正され、精度が向上する。しかしながら、内標準の使用が不適切であれば、分析測定の重要事項である変動要因があいまいになる場合がある。内標準を使用する場合は、操作のできるだけ早い段階で試料に添加すべきであり、分析開始前に試験試料に添加するのが望ましい。内標準は、対象とする分析成分の回収率を、一定の、そして、予測可能な形で反映しなくてはならない。分析法において、対象となる分析成分の挙動を反映しない内標準は、最終結果の計算で重大な誤差を招く。内標準を選定する際は、内標準が対象の分析成分の回収率を変更したり、測定過程に干渉したりすることがないように注意しなければならない。分析法に対する内標準の影響の程度及び予測可能性を知ることが重要である。内標準は、適切に使用されると分析法の性能を大きく向上させることができる。

分析環境に関する検討事項

192. 残留規制分析法が変動の大きな物理的試験環境で用いられる場合、これらの分析法の開発及び妥当性評価ではこの旨を考慮に入れるべきである。これらの問題に対処することで、分析法の堅牢性が向上する可能性がある。温熱環境では、試薬は熱的に安定であることが要求され、一方、分析に用いられる溶媒はより揮発性が低く、試験試料の要件はより許容性があることが求められる。低温環境では、試薬と溶媒に対し、分析成分を効果的に抽出するため、より低い凝固点やより大きな溶媒と特性など、異なる物理的性質が要求される場合がある。環境温度は、応答速度、重力分離及び発色に影響するだけでなく、分析に要する時間に影響する可能性がある。これらの要因を補正する必要があることから、広範囲の異なる環境での分析法の使用のために分析法を標準化することはいっそうの努力が要求される。分析法が使用される物理的環境を考慮する場合に重要なのは、容積測定ガラス器具及び多くの分析装置は、特定の温度又は制御された温度範囲内で使用されるように較正されることを思い起こすことである。これらの温度外での操作は、試験結果が損なわれる可能性がある。

妥当性評価モデルの選択

193. 単一の試験室のみで開発され及び使用される分析法は、残留規制プログラムで使用するには限界があるが、ISO/IEC-17025 又はそれと同等の試験室の認証手続きに関連した単一試験室の分析法妥当性評価のための厳格な要求を満たすよう注意が払われるのであればこの限りではない。厳格な精度管理が行われたとしても、実施中の技能プログラムで得られたデータ、試験室間試験により妥当性評価された適切な分析法との比較、又は他の形式による試験室間比較の結果による裏付けがない限り、報告値の信頼性が懸念される場合がある。理想的には、分析法は少なくとも3試験室で妥当性評価すべきである。単一試験室において適切に設計された堅牢性検査とともに慎重に妥当性評価された分析法は、少なくとも 8 つの異なる試験室を含む試験室間共同試験においても成功するはずである。

194. 残留規制分析法の単一試験室分析法妥当性評価、多施設分析法試験又は試験室間共同試験の実施に関する原則は同じである。分析法の性能を評価するための試料は、分析者には知られておらず、無作為化された複製試料で、MRLVD 又は他の標的濃度付近の残留物を含有し、並びに対象となる濃度以上及び以下の分析成分を含有する試料及びブランク検体を含むべきである。少なくとも3つの独立したデータセットが、3回の分析期間[少なくとも別々の3回(少なくとも1日間隔)]で、望ましくは反復分析によって生成され、分析法性能の統計的評価を向上させ、日間変動を推定すべきである。上記は最低限の要件であることに留意すべきである。統計に基づく分析法の性能基準の設定は、分析法をテストする独立した分析者及び試験室の数、並びにテストされた試料数を増やすことにより向上する。単一試験室妥当性評価では、複数の分析者によって分析法をテストし、適切な試験室内性能基準を提供することが推奨される。妥当性評価を拡張し他の試験室を含める(望ましくは試験室間共同試験に要求される数)ことが推奨される。8 試験室のみで行われる試験室間共同試験プロトコル⁷で要求される、1種類又は2種類の動物種及び組織を用いたブラインド反復試料の分析によって得られる全般的な併行精度及び再現精度の推定には限界がある。共同試験された分析法の妥当性評価は、必要に応じて、単一の専門試験室で実施される後続の試験で組織及び種類を追加するために拡張することができる。

品質管理システム

195. 品質管理システムは、残留分析の必須な要素である。品質管理システムでは、分析者により試料の分析に関連する因子を監視するとともに、分析プログラムが許容される方法で実施されていることを保証するため独立した査閲者による監視が行われる。認定された品質管理システムの使用は、残留規制当局の意思決定を支援する上で非常に貴重であり、消費者、生産者及び食品中の残留動物用医薬品に関する立法機関に対して食品の安全性を示すために、残留規制プログラムにおいて分析結果の信頼性を高め、かつ質の高いデータを提供する。規制管理試験室には、IUPAC により公表された原則に従った品質基準を設定することが推奨される。

¹⁵ EURACHEM/CITAC 分析測定における測定不確かさの算出に関するガイド (Guide to Quantifying Measurement Uncertainty in Analytical Measurement), <http://www.measurementuncertainty.org/mu/guide/index.html>, 2007年9月18日にアクセス。

資料⑥: OECD GUIDELINES FOR THE TESTING
OF CHEMICALS

Test No.503: Metabolism in Livestock

経済開発協力機構(OECD)の化学物質の試験に関する ガイドライン

家畜代謝

本文書の原文は下記のタイトルで、英語で公表されたものである。

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Test No.503: Metabolism in Livestock

https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-5-other-test-guidelines_20745796

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に応じ原文を参照ください。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます

経済開発協力機構(OECD)の化学物質の試験に関するガイドライン

家畜代謝

緒言

1. 家畜代謝試験は、飼料中の農薬使用、家畜への直接投与又は前処理によって生じる有効成分の代謝物及び／又は分解物を定性的及び定量的に明らかにする試験である。家畜代謝試験は、一般に、泌乳反芻動物及び家禽について実施される。
2. 家畜代謝試験は複雑である。生体異物代謝及び抱合体形成、動物巨大分子の分離及びモノマー／オリゴマーを生成する手順を研究するために用いられる科学技術は、絶えず進歩している。従って、最先端の技術利用し、そのような技術を用いた際にその引用文献を提供するのは申請者の責務である。

目的

3. 家畜代謝試験はいくつかの目的を満たす。
 - － 家畜由来食品及び排泄物中の総残留物の推定を提供する。
 - － 可食組織中の最終残留物の主要成分を同定し、残留定量試験において分析される対象成分(すなわち、リスク評価及び規制施行の両方に関する残留の定義)を示す。
 - － 反芻動物及び家禽における農薬の代謝経路を明らかにする。
 - － 残留物が脂溶性(fat soluble)に分類されるべきか否かの根拠を提供する。

試験の実施

一般的な考慮事項

4. 農薬の使用により人のフードチェーンに残留物が侵入すると考えられる場合はいつでも、有効成分の吸収及び生体内挙動を明らかにするために、家畜代謝試験が必要である。さらに、農薬が加水分解(酸、塩基又は酵素により)、酸化又は還元、光分解、その他の変化を受ける可能性があるかどうかを示すには、*in vitro* データが有用である。

5. 農薬を家畜に直接投与する場合、登録者は当該使用が農薬又は動物用医薬品として規制を受けているかどうかを判断するため、国内当局に相談することが望ましい。動物用医薬品の直接投与に関するハーモナイズされたガイダンスも国際的に策定中である¹。
6. 申請者は、関連する化学構造や化学名(化学情報検索サービス(CAS)や国際純正・応用化学連合(IUPAC)名が使用可能)の表とともに代謝経路を提案すべきである。予想される中間体／代謝物も代謝経路に示すべきである。代謝試験において、残留物の成分が遊離体、抱合体又は抽出不可能であるかどうかの判定に用いられた分析法の性能について明記すべきである。
7. 申請者は、最大残留基準値(MRL)案に将来影響を及ぼす可能性のある新規で予期しない農薬の代謝物が存在する可能性に常に注意すべきである。代謝物又は変質生成物の構造が、別の登録済みの農薬と同一で、その情報が公開されている場合、申請者はその旨を明記すべきである。
8. 農薬に関する一連の実験条件ごと(経皮、経口投与又は放射性標識位置ごと)に、以下の数の動物を用いるべきである。反芻動物代謝試験は、1頭で行うことができる。家禽については、実験(又は用量)ごとに10羽を使用することが推奨される。これらの試験の目的は、可食マトリックス中の放射性残留物の統計解析ではなく、残留物の吸収、移行及び生体内分布についての定性的評価であることに留意すべきである。申請者は、科学的に必要であると考えられる場合、自由に動物を追加してよい。
9. 申請者が家畜代謝試験の使用によって、家畜飼養試験に関するデータ要素の免除を希望する場合、実際の適用量で処理された第2の動物(又は家禽では動物群)を追加することが強く推奨される。さらに、申請者は、第2の動物の投与期間について、その期間では定常状態に達しない可能性が高いと予想される場合には、延長を希望することができる。飼養試験に関する免除を申し出るには、特に代謝試験で乳又は卵中で定常状態に達していない場合、十分に適切な科学的根拠が要求される。
10. 家畜代謝試験は、放射性標識された被験物質を用いて実施すべきである。家畜代謝試験の目標として、各可食組織、乳又は卵中の総放射性残留物(total radioactive residue:TRR)の少なくとも90%について同定及び特徴付けを行うことが望まれる。多くの場合、特に総残留量が少ない、生体分子に取り込まれている、又は農薬の大部分が多数の低濃度成分に代謝される場合、TRRの重要な部分を同定できない可能性がある。後者の場合、申請者はそのような成分の存在及び濃度を明確に示し、可能であればそれらの特徴付けることを試みるのが重要である。

家畜における残留の特徴

11. これらガイドライン(OECD 試験ガイドライン 417 毒物速度論 Toxicokinetics)の毒性学セクションで必要とされる実験動物における農薬の代謝に関するデータは、一般に、家畜に関する代謝データの代替とはならない。しかしながら、これらの非臨床試験から得られた動態情報は、家畜代謝試験の設計に重要な役割を果たすことができる。一部の例外として、残留物の十分な特徴付け及び／又は同定が得られない家畜代謝試験の補足資料に実験動物の代謝データを使用することができる。

¹ 本ガイドライン執筆時、当専門家グループは VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products 動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力) プロセス及び CCRVDF (Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food コーデックス委員会食品残留動物用医薬品部会) とその科学諮問機関である JECFA の存在を認識していた。

12. 一般的に、反芻動物と家禽について個別の代謝試験を実施すべきである。供試動物種は泌乳山羊及び鶏(産卵鶏)とする。ラットの代謝と反芻動物又は家禽の代謝とが顕著に異なる場合、非反芻動物(豚)の代謝試験を必要とする場合がある。そのような相違には、以下の場合が含まれるがこの限りではない。

- 代謝の程度の相違
- 観察された残留物の性質の相違
- 毒性学的懸念が知られている部分構造を有する代謝物の出現

13. 家畜代謝試験では対照動物を用いる必要はない。順化期間は、試験で投与する前に、家畜の乳量及び産卵数が良好に維持されるように確保すべきである。

14. 動物代謝試験で用いられる相対用量の推定は、すべて乾燥重量ベースに基づくべきである。これらの実験における投与濃度を決定するために、処理作物割合(percent crop treated)の情報や残留物の中央値の使用は許容されないことに留意すべきである。

15. 家畜経口代謝試験で用いる最低用量は、観察された最大残留濃度の処理作物を給餌することにより予想される曝露量に近似すべきである。経皮投与の場合、最低用量はラベルに表示の最大濃度とすべきである。特徴付け及び/又は同定のために組織中に十分な残留物を得るためには、通常、過大な用量が必要である。いずれにせよ、経口試験では最低でも 10 mg/kg の飼料中濃度で家畜に投与すべきである。動物に経口投与すべきである。反芻動物及び豚については、少なくとも 5 日間、家禽については少なくとも 7 日間、毎日投与すべきである。

16. 以下の理由により、家畜には被験物質を事前投与すべきでない。

- 事前投与は、酵素経路の誘導をもたらす可能性がある。
- 事前投与は、親化合物及び代謝物の比放射能に変化を引き起こし、組織、乳及び卵中の比放射能レベルが低くなり、残留物の輸送の程度がマスキングされ、従って最終残留物の成分の同定を妨げる可能性がある。

また、TRR の成分の比放射能に相違が生じると、親化合物と代謝物の相対量の比較が不確かになる可能性がある。

17. 家畜代謝試験の実施中、申請者は、MRL/許容値又は食事リスク評価の目的のために定義された残留物を効率的に抽出するための分析法(規制施行及びデータ収集)の能力に関して、発生する可能性のある将来の問題を念頭に置く必要がある。好ましくは、肝臓及び乳の試料を用いるべきであるが、特定の代謝物が特定の臓器に蓄積する場合、当該臓器の試料も保存すべきである。従って、放射性標識された試料は、後に開発される分析法による将来の分析(ときに分析法の「ラジオバリデーション」と呼ばれる)のために保存する必要があると考えられる。しかし、分析法の抽出手順が放射性標識試験で用いられたものを反映する場合、そのようなデータは一般的に必要なものであろう。

試験方法の解説

放射性標識された農薬の投与

18. 総残留物、抽出性残留物及び非抽出性残留物の定量を可能にするためには、放射性標識された有効成分が必要である。有効成分は、分解経路を可能な限り追跡できるように標識されるべきである。放射性標識は、すべての重要な構造部分又は分解生成物が追跡できるように分子内に配置するべきである。複数の環構造や重要な側鎖が存在する場合、このような構造部分間で開裂が起こることが予想されるのであれば、通常、それぞれの環又は側鎖を標識した個別の試験が要求されることになる。開裂しないことが予想される場合は、複数の放射性標識を用いた試験を実施する代わりに、科学的根拠に基づく理論的説明を提出することができる。しかしながら、分子の開裂が明らかな場合、申請者は開裂する分子部分を追跡する放射性標識を用いて追加試験を行うよう要求される場合がある。

19. 標識位置を選択する際には、安定した位置が選択されているという保証が求められる。放射性同位元素には ^{14}C が好ましいが、分子中に炭素が存在しない場合や不安定な炭素側鎖しかない場合には、 ^{32}P や ^{35}S 又は他の放射性同位元素の方が適切な場合がある。標識としてのトリチウム (^3H) の使用は、内因性物質と水素交換する可能性があることから、使用しないよう強く推奨される。不安定と考えられる側鎖への標識やトリチウム標識を選択する場合、動物中の重要な放射性物質がすべて同定され、農薬に関連することが判明し、かつ、農薬分子の基本構造から標識が喪失しない場合のみ、代謝試験は適切であるとみなされる。

20. 放射性標識された有効成分の比放射能は、家畜代謝試験のデータ要求事項(可食組織、乳又は卵における総 TRR 0.01 mg/kg の定量)を満たすのに適切であるべきである。

21. 国家又は国際当局は、「トリガー値 trigger values」(30 項及び表 1 参照)の計算に過大率を使用する状況を認めない場合がある。例えば、動物に過大率(例えば 5 倍量)で放射性標識物質を投与する場合、トリガー値を導くために得られた放射性物質濃度を過大率(すなわち、5)で除すべきではない。従って、閾値レベルを超えるか又は超えないかの決定には、通常 1 倍投与量を用いた試験が必要とされる。しかし、申請者により低い残留濃度が予想され、(1 倍投与量では)代謝経路の決定に十分なデータが得られない可能性がある場合、過大率を用いて投与することが推奨される。過大率で実施された試験から 1 倍濃度残留物を計算することは、それぞれの規制当局に委ねられており、これらの当局がどの同定された残留物を規制対象とするべきかを決定した場合のみ許容される可能性があることに注意する必要がある。

22. 様々な分光分析法(質量分析 mass spectrometry (MS) や核磁気共鳴法 nuclear magnetic resonance (NMR)) による代謝物の同定を支援するために、放射性標識同位体とともに ^{13}C 、 ^{15}N 又は ^2D (非交換性)などの安定同位体の使用が推奨される。

23. 家畜代謝試験は、1 つの化合物(通常、親化合物)の給餌を反映すべきである。経口試験の投与物質は、有効成分と植物代謝産物との混合物とすべきでない。植物体代謝産物が動物代謝産物でもあることが判明した場合は、植物体代謝産物を投与する追加の家畜代謝試験は一般に必要なない。植物体代謝産物が飼料中の TRR の大部分を占める場合、植物体代謝産物を投与する家畜代謝試験が必要となる場合がある。特有の植物体代謝産物が観察される場合、家畜代謝試験が要求される場合がある。申請者は、適切な有効成分についてのガイダンスが必要な場合は、適切な規制当局に相談することが望まれる。

24. 経口投与の場合、有効成分が完全に投与されるよう投薬銃、カプセル又は強制飼養により家畜に投与すべきである。

25. 皮膚代謝試験を検討する場合、優先的に経口試験と同じ動物種を用いるべきである。さらに、賦形剤、投与回数、投与量、及び投与方法についても記載すべきである。当該投与と動物に対し提案されている使用方法の比較について、処方、投与量又は他の実験パラメーターの相違を説明するよう特に注意を払い記載すべきである。過大率であっても低濃度の放射能しか観察されない場合、アジュバントや一般的な不活性成分の利用は、有効成分の動物への経皮吸収が促進される可能性がある。申請者は、経皮的に適用された農薬が毛づくろいにより経口的に摂取されないことを保証するために、どのような措置を講じたか説明すべきである。これは反芻動物では特に重要である。

屠殺時期

26. 家畜代謝試験の主な目的の 1 つは、屠殺時の可食組織、乳及び卵中の残留物を同定することである。申請者は、これらの試験で用いられた動物種の屠殺時期について、選定の科学的根拠を示すことを求められる場合がある。屠殺時期は、優先的に最終投与後 6～12 時間とすべきことが望まれる。しかし、屠殺時期は最終投与後 24 時間を決して超えるべきではない。[データ報告に関する考慮事項 – データ – 材料/方法 – e) 屠殺時期の項参照]。

動物試料の採取

27. 排泄物、乳及び卵は、毎日 2 回採取すべきである(適用可能な場合)。採取対象の組織には少なくとも筋肉(反芻動物では腰部及び脇腹の筋肉、家禽では脚及び胸の筋肉)、肝臓(山羊及び家禽では臓器全体、牛又は豚を使用する場合は肝臓の異なる葉の代表的な部分)、腎臓(反芻動物のみ)、脂肪(腎、大綱、皮下)を含むべきである。TRR は、すべての組織、排泄物、乳及び卵について定量すべきである。乳については、脂肪画分を物理的方法によって水溶性画分から分離し、各画分の TRR を定量すべきである。尿及び糞中の残留物の特徴づけ及び同定は、しばしば組織中の低濃度の残留物の特徴づけに役立つが必須ではない。異なる筋肉及び脂肪タイプにおける放射能は、別々に定量すべきである。放射能の濃度が組織タイプ内で同様の場合、代謝物を分析する前に試料をプールすることができる。しかしながら、申請者は、これらのプールされた試料中の異なる筋肉タイプ及び脂肪タイプの相対比率が、動物内の当該組織の相対的重要性を代表することを確保すべきである。それらが著しく異なる場合は、異なる筋肉及び脂肪タイプについて代謝物分析を実施すべきである。採取した臓器の肉眼的病理検査を行うことが望ましい。異常所見が得られた場合には、これを記録し報告すべきである。

分析段階

28. 家畜代謝試験の分析段階では、分析対象となる動物試料をサンプリングし、細切又はホモジナイズし、TRR を測定する。すべての放射能の完全な説明責任が担保されなければならない。

29. 試料は、予想される残留物の性質に基づき、様々な極性や他の特性を有する一連の溶媒及び/又は溶媒系(水溶性を含む)によって抽出される。これらの最初に得られた残留物は、抽出性残留物と定義される。抽出性残留物の特徴付け及び/又は同定に関する要求事項は、表 1 にまとめられている。

30. 以下に記載された経路は、家畜代謝試験が許容されると判断するのに必要な情報の種類に関する大まかな概要とみなすべきである。特定の状況では、異なる手順や方法が適切な場合がある。

提出された試験が適切であることを担保するには、放射能の同定のための「トリガー」値に関する基本概念、放射能の特徴付け及び／又は同定に必要な方法論、及び非抽出性残留を十分に遊離させるために行なうべき手順に従うべきである。これらのトリガー値(表 1 参照)は大まかなガイダンスを示し、代謝物が特定の毒性学的懸念を疑われる場合、又は TRR の 10%未満が高い絶対残留濃度を示す場合には適用されない可能性がある。

31. 同定 Identification とは、総放射性残留物の成分の正確な構造決定をいう。一般的に、同定は、2 種類の異なるシステムを用いた代謝物と既知の標準物質とのクロマトグラフィー、又は MS や NMR などの明確な構造決定が可能な手法のいずれかの方法で行われる。クロマトグラフィーの場合、同じ固定相で 2 種類の溶媒系を用いたクロマトグラフィー手法は、分析法が独立していないことから代謝物の同定に適切な 2 種の方法による検証とはみなされない。クロマトグラフィーによる同定は、逆相と順相薄層クロマトグラフィー-thin layer chromatography (TLC) や高性能薄層クロマトグラフィー-high performance layer chromatography (HPLC) などの分析的に独立した 2 種類の異なるシステムを用いて行うべきである。クロマトグラフィー分離の質が適切であれば、分光分析法による追加の確認を行う必要はない。明確な同定は、次のような構造情報を提供する方法を用いても得ることができる: 液体クロマトグラフィー／質量分析(LC-MS) 又は液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析(LC-MS/MS)、ガスクロマトグラフィー／質量分析(GC-MS) 及び NMR。絶対濃度が低い(0.05 mg/kg 未満) 又は TRR に対する比率が小さい(TRR の 10% 未満) ことにより、代謝物がほとんど重要性はないと判断される場合、逆相 HPLC などの 1 種類のクロマトグラフィー手法を用いて、推定合成代謝物を参照物質として共溶出による同定が許容される。

32. 特徴付け Characterization とは、代謝物の同定が不十分な放射性残留物の一般的性質／特性を解明することをいう。残留物の特徴付けに使用される用語には、有機溶媒可溶性、水溶性、中性、酸性又は塩基性、極性、非極性、非抽出性などがある。特徴付けには、共通構造の変換や特定の試薬への反応性に基づき分子中に存在することが知られている化学構造部分の説明も含まれる。特徴付けの程度とは、帰属が構造の同定にどの程度近づいているかをいう。

33. 放射性残留物の同定が達成できない場合、総放射能の一部に要求される特徴付けの程度は、いくつかの要因、すなわち、存在する残留量、すでに同定されている TRR 量、食品としての家畜食品の重要性、化合物群に関する毒性学的懸念、実施済みの特徴付けによって推測される残留物の重要性、及び特徴付けられているが同定には至っていない残留物を検出する分析法の能力に依存する。

34. 非常に過大な飼料中濃度で実施され、組織中の放射能濃度が低い代謝試験では、予想される飼料負荷量によって畜産物に顕著な放射能をもたらす場合よりも、特徴付け及び／又は同定の要求事項は、厳しくならないようにすべきである。例えば、家畜に対する予想される飼料負荷量が約 0.01 mg/kg の場合、飼料中濃度 10 mg/kg の放射性標識化合物を投与(1000 倍)し、組織、乳、卵中の総放射能が 0.1 mg/kg 未満であった場合、(毒物学者が当該濃度の残留物に特別の懸念を示さない限り) 残留物について最低限の特徴付け及び／又は同定で十分であるはずである。このような状況は、施用量が低いシーズン初めの除草剤にみられることが多い。

35. 予想される濃度の農薬を含む飼料を摂取した家畜由来食品中に 0.01 mg/kg を超える放射能濃度が観察された場合、通常、残留物の完全な同定が必要となる。これは、生育期後期に農薬が高用量で作物に施用されるときに起こりやすい。表 1 に概説されている手順に従うことが望ましい。

36. 代謝物の立体化学は、一般に決定される必要はない。残留の定義に立体化学を中心とする同定された代謝物が含まれ、毒性学的懸念がある場合、監視圃場試験において立体異性体の比率について対処が必要な場合がある。

37. 新たな抽出及び分析手法の使用が、上記の手法に代わるものとして利用するのに適切な場合がある。超臨界流体抽出法 supercritical fluid extraction (SFE)、マイクロ波抽出法 microwave extraction、高速溶媒抽出法 accelerated solvent extraction (ASE) などの代替抽出法を用いることができる。いずれの場合も、代謝経路を完全に解明するためには、利用可能な最善の技術を用いるべきである。

表 1. 家畜代謝試験における抽出性残留物の同定及び特徴付けに関する方針

相対量 (%)	濃度 (mg/kg)	必要な措置
< 10	< 0.01	毒性学的懸念がなければ措置なし。
< 10	0.01 – 0.05	特徴付け。例えば、参照物質が入手可能か、又は以前の試験で同定されているなど、容易に行える場合のみ、同定を試みる。
< 10	> 0.05	特徴付け／同定は、どのくらいのものが同定されたかを考慮して、ケースバイケースで決定する必要がある。
> 10	< 0.01	特徴付け。例えば、参照物質が入手可能か、又は以前の試験で同定されているなど、容易に行える場合のみ、同定を試みる。
> 10	0.01 – 0.05	特に代謝経路を設定する必要がある場合は、積極的に同定を試みるべきであり、最終的には特徴付けが受け入れられる可能性がある。
> 10	> 0.05	すべての可能な手段を用いて同定する。
> 10	> 0.05 非抽出性放射能標識	「非抽出性放射性標識物質」-43 項及び図 1 参照。

代謝物の同定が必要な場合を決定するための方針

38. 表 1 に示されている放射能の閾値は、放射性標識された被験物質を投与後の各組織又は臓器に必要とされる特徴付け及び／又は同定の最低濃度を反映している。動物由来食品中の総放射能が 0.01 mg/kg 以下の場合、より低濃度で生じる残留物に対する毒性学的懸念が認められる場合を除き、放射能の分別をする必要はない。0.01 mg/kg を超える放射能については、様々な極性の溶媒又は混合溶媒を用いて抽出すべきである。その後クロマトグラフィー分析 (TLC、HPLC) によって抽出性放射能の成分を定量し、必要とされる特徴付けの程度を決定すべきである。

39. 抽出性放射能が 0.01mg/kg 以下の場合、これ以上の調査は必要ない。抽出性放射能が 0.01–0.05 mg/kg の場合、この放射能のクロマトグラフィーの挙動は、農薬の親化合物及び考えられる代謝物のもとの比較(特徴付け及び／又は同定)することができる。

40. 抽出性放射能が 0.05mg/kg 又は TRR の 10%のいずれか大きい方を超える場合、抽出画分ごとに特徴付け及び同定を試みるべきである。本事項に関する例外は、より低濃度で発生する可能性がある残留物に対する毒性学的懸念がある場合と考えられる。

41. 低濃度(mg/kg 及び総残留量に対する百分率の両方について)の個々の残留物については、残留物の主要成分が同定されているのであれば、一般に同定する必要はない。例えば、組織(又は臓器)中の総放射能が 3 mg/kg でかつ 75%が明確に同定されている場合、0.05–0.1 mg/kg の範囲にある一連の個々の残留物の同定を求められる可能性は低いと考えられる。一方、総放射能が 0.3 mg/kg にすぎない場合、0.05–0.1 mg/kg の残留物の同定に向けた幅広い努力が期待される。トリガー値(濃度ベース)は絶対的な基準ではなく、どの程度の特徴付けが適切であるかに関するおよその目安であることに留意すべきである。しかしながら、多くの場合、潜在的に重要な代謝物は、その溶解特性のために、及び／又は遊離体及び抱合体の両方の形態で存在しているために、複数の抽出画分に分配される。トリガー値を適用するためには、特に TRR が多数の抽出画分に分配される場合には、この成分を合計した濃度(総量)がトリガー値を大きく超えるような量で、単一の代謝物が様々な異なる画分に分配されないことを(例えば、各画分のクロマトグラフィー分析などにより)実証すべきである。

42. 表 1 に示されている放射能濃度は、家畜代謝試験で用いられる投与量に関係なく適用される。用いられた投与量が不十分で、残留物の特徴付け及び／又は同定に十分な放射能が得られない場合、十分な量の放射能を得るために、例えば、比放射能の増加、適切な屠殺時間又は過大投与などの適切な方法により、追加試験が必要とされると考えられる。

非抽出性残留物の遊離

43. 放射性残留物が家畜内で非抽出性として観察されるには以下の 3 つの状況がある。

- 生体分子(すなわち、アミノ酸、糖など)への取り込み。これは、被験物質が、動物体内で新たな細胞成分が生合成される際に使用される内因性物質の炭素プールに入るほど小さい(通常 1 つ又は 2 つの)炭素単位に分解されるときに起こる。
- 生体内分子の特定の構造部分との化学反応又は物理化学的な強固な結合による結合残留物の形成であり、結合残留物は他の化学反応(例えば、酵素的又は酸/塩基加水分解など)により遊離させることができる。
- 家畜マトリックスへの放射性残留物の封入(捕獲)又は組み込み。この場合に残留物を遊離するには、通常、塩基を用いた徹底処理による組織の可溶化が必要となる場合があるが、界面活性剤を用いてあまり過酷ではない条件で残留物を遊離させることも可能である。

44. 非抽出性残留物を処理するための以下に示す一般的な手順は、これらの残留物の特徴付け及び／又は同定に関する指針及び説明を提供することを意図している。

45. 抽出された個体動物試料を分析し、放射能が 0.05 mg/kg のトリガー値又は TRR の 10%のいずれか大きい方を超える場合は、放射能の遊離を試みるべきである(表 1 参照)。毒物学者が、より低濃度で潜在的残留物に懸念を示す場合、トリガー値は必ずしも適用されないことに留意する。

46. 表 1 の各段階では、遊離された残留物の総放射能を定量すべきである。特徴付けに関し、遊離された放射能(水溶性物質を含む)のクロマトグラフィーの挙動は、親化合物及び構造的に親化合物に近い予想代謝物のものと比較すべきであることに留意する。これは遊離された放射能が化学的に親分子と異なるかどうかを示す。規定の手順後に残った非抽出性放射能が 0.05 mg/kg 未満又は TRR の 10% 未満の場合、これ以上放射能の遊離を試みる必要はない。

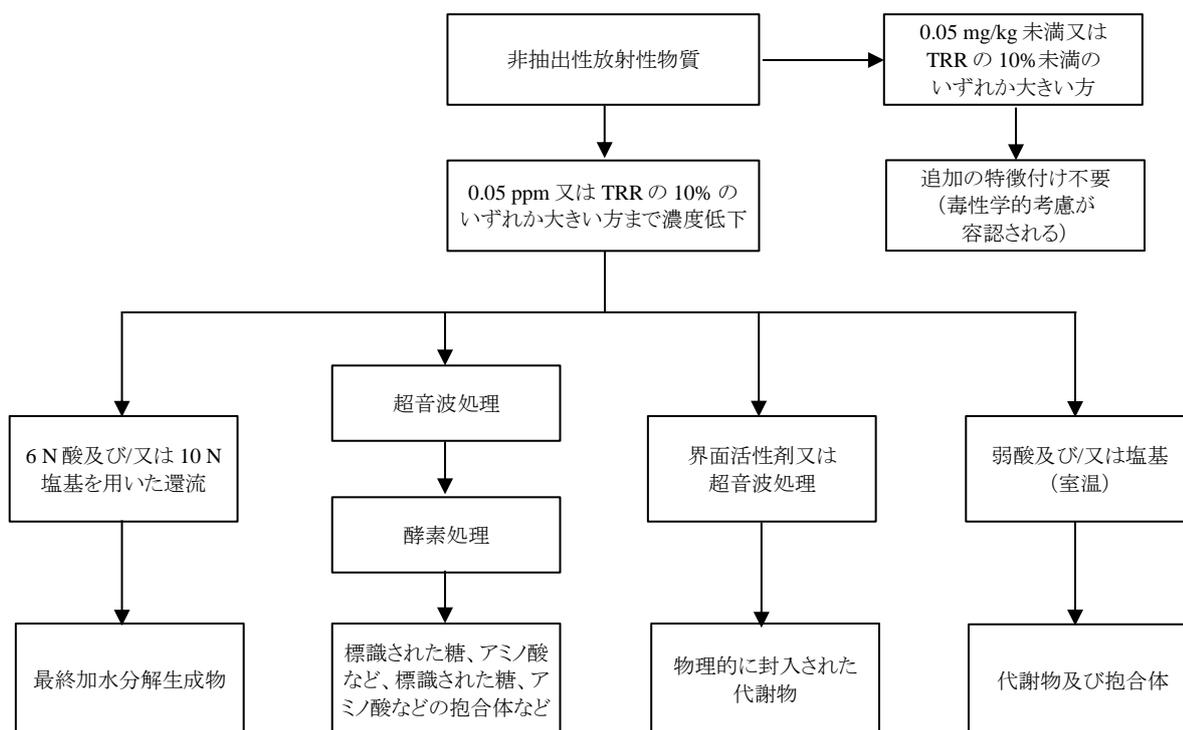
47. 処理は連続的に行うかサブサンプルについて行うことができる。処理の種類には、37°C で弱酸及び弱塩基の添加(これらの手順は、代謝及び分析法開発の両方の検討事項として最初に用いられるべきである)又は界面活性剤、酵素、6N 酸及び/又は 10N 塩基を用いた還流が含まれる。手順が穏やかなほど遊離された代謝物構造の正確な帰属が得られることを念頭におくべきである。すなわち、酸/塩基による還流は、最終的な加水分解生成物としての構造部分を遊離すると考えられ、放射能の抱合された非抽出性の形態とはほとんど関係しない可能性がある。

48. 室温での酸処理及びそれに続く室温での塩基処理は、抱合結合部分を穏やかに加水分解し、組み込まれた放射能を含有する生体分子を再び遊離することができる。界面活性剤の使用は、物理的に封入されたか又は膜結合した残留物を遊離することができる。膜及び/又は細胞壁の破壊は、基質の酵素への近づきやすさを向上させることができるので、超音波処理操作を実施し、続いて慎重に選択した酵素の組合せによる処理を行うべきである(注: その都度、利用される各酵素の活性を確認すべきである)。これらの手順は、取り込まれた放射能を含有する任意の生体分子を含む化学的に結合した残留物を遊離することができる。

49. 最後の遊離処理は、酸及び塩基を用いた還流による加水分解で、これにより動物組織を可溶化すると考えられる。この時点で遊離された放射能は、アミノ酸、糖及び封入又は抱合された化合物を反映していると考えられ、元の非抽出性/封入構造と関係する場合としない場合がある。しかしながら、この処理は、農薬の残留物が遊離可能であるとの証拠を示し、取り込まれた放射能に関するデータ及び代謝物の性質に関する限定的な情報を提供することができる。すべての場合において、加水分解処理過程を除き、分解/アーチファクトを抑えるため、試料、ホモジネート及び抽出物は低温で維持すべきである(保存安定性に関する 52~55 項の考察参照)。図 1 は、上述の処理段階の視覚的な説明を提供する。

50. アミノ酸、糖、フェノール化合物、ヌクレオチドなどの放射性標識された特定の内因性化合物を同定することは、一般に、農薬が小さい炭素単位に分解され炭素プールに入り込んだことを意味するので、多くの場合、非抽出性残留物のさらなる特徴付け及び/又は同定の必要性が軽減できる可能性がある。しかしながら、この結論は、トリチウム標識化合物又は ^{14}C 標識が分子の不安定な位置に取り込まれている農薬には適用されない。この結論は、TRR の大部分を占める(TRR の 10% を超えるか、又は 0.05 mg/kg を超える)単一の遊離代謝物が同定されていない場合にも適用されないものと考えられる。

図 1 非抽出性残留物及び結合残留物の特徴付け及び同定



51. 表 1 及び図 1 に関するコメント

- 図 1 の各段階において、遊離された残留物の放射能を定量すべきである。抽出性残留物について表 1 に示すトリガー値が満たされた場合、放射能は様々な溶媒/混合溶媒に対して再度分配し、必要に応じて特徴付け及び/又は同定を行うべきである。特徴付けについては、特に重要な点として、遊離された放射能(水溶性物質を含む)のクロマトグラフィーの挙動は、親化合物及び構造的に親化合物に類似する予想代謝物のクロマトグラフィーの挙動と比較すべきである。これにより、遊離された放射能が化学的に親分子と異なるかどうかを示される。規定の手順後に残った非抽出性放射能が 0.05 mg/kg 未満又は TRR の 10% 未満となった場合、これ以上放射能の遊離を試みる必要はない。
- 表 1 に示すトリガー値は、非常に低濃度及び重要でない濃度で存在する代謝物の特徴付け及び/又は同定の必要性を否定することを意味する。しかしながら、多くの場合、潜在的に重要な代謝物は、その溶解特性のために、及び/又は遊離体及び抱合体の両方の形態で存在しているために、複数の抽出画分に分配される。トリガー値を適用するためには、特に TRR が多数の抽出画分に分配される場合には、この成分を合計した濃度(総量)がトリガー値を大きく超えるような量で、単一の代謝物が様々な画分に分配しないことを(例えば、各画分の HPLC 分析などにより)実証すべきである。

保存安定性

52. 試料の採取、調製及び保存中に試料の一貫性が維持されているかどうかを判定すべきである。そのような分析は、放射性残留物の基本的なプロファイルが試験期間を通して変化していないことを示すべきである。

残留物の同定及び代謝試験に必要な期間を設定する前に、試料に添加することはできない。試験の分析段階においてマトリックス及び抽出物が適切に保管され、残留物の分解を抑える対策が講じられているという立証があれば、採取後 6 ヶ月以内に分析される試料については、通常、保存安定性データを必要とされない。

53. 他の情報に基づき、有効成分の不安定性が疑われるか観察された場合は、試験の完全性を保護するために措置を講じるべきである。試料採取後 6 ヶ月以内に代謝試験が完了できない場合は、採取から最終分析までの間に残留物の同一性が変化しなかったという証拠を提供すべきである。これは試験の初期及び終了時に代表的な基質を分析することにより行うことができる。基質は保存されたものとするべきである。すなわち、マトリックス抽出物が試験を通して使用され、そのマトリックスが試験の後半で抽出されない場合、抽出物の安定性を示すべきである。

54. 変化が観察される場合(例えば、特定の HPLC ピーク又は TLC スポットの消失など)、追加の分析又は採取から分析までの期間を短縮して別の代謝試験を必要とする場合がある。

55. 代謝試験試料は、理想的には -18°C 以下で保存すべきである。他の条件下で保存する場合は、これを記録しその根拠を示すべきである。

明確化

56. 放射性残留物のクロマトグラフィー(例えば、HPLC、TLC など)では、溶媒系の極性は、分析対象化合物の極性によって決定されるべきであり、すなわち、溶媒極性は対象化合物に合わせるべきである。

57. 比放射能を 1 g 当たりの毎分崩壊数又はキュリー/モルの代わりに、メガベクレル/ミリグラム(MBq/mg)として報告すべきかどうかについては、報告されたカウントを用いて放射能濃度の算出が可能であればいずれの単位も許容される。適切な規制当局が、動物組織及び各種クロマトグラフィー画分について報告された濃度(mg/kg)を検証できるように、カウントに関する十分な情報を提示すべきである。使用された単位に関わらず、分析者が実験データからどのように濃度(mg/kg)を導いたかを示す算出例を提示すべきである。

58. 同定に重要な TLC 板又はオートラジオグラム(鮮明な画像又は放射能分析画像検出)を提示すべきである。放射能を測定可能な検出器と組み合わせた HPLC を用いた場合、適切なラジオクロマトグラムを提出すべきである。用いたクロマトグラフィー手法にかかわらず、分析標準物質の挙動を示すクロマトグラムも報告書に添付すべきである。

59. 申請者は、最低でも食品に使用される可能性のある家畜組織ごとに、総 mg/kg 放射能濃度(通常は親農薬相当)を報告すべきである。すべての動物部位/組織中で放射能が測定される試験では、各組織中の総放射能に対するパーセントを報告することが有用である。

60. 分析法の抽出過程のラジオバリデーションは、分析法や代謝に関する報告書の一部として提出するか、又はそれ自体を報告書とすることができる。フルデータパッケージのカバーレター又は要約に、このデータの所在を記載すべきである。

データ報告に関する考慮事項

データ

61. 試験の設計、実施及び報告にあたっては、次にあげる要素を考慮すべきである。

一般的な考慮事項

- (i) 投与濃度、投与方法又は適用方法を含む放射性同位体標識手法。
- (ii) 遊離型か非抽出型かにかかわらず、各試料の残留成分の同定に用いた抽出、分画及び特徴付けの手法。
- (iii) 総最終残留物の定義、組織又は臓器内でのそれらの分布を反映する総最終残留物のすべての主要成分に関するデータを含み、屠殺時に検出された、回収された総放射能に対するパーセント及び濃度 (mg/kg) の両方で表される。
- (iv) 詳細な考察、好ましくは可能性のある分解経路又は観察された代謝経路のフローシートを添付する。推定された(しかし、同定されていない)代謝物/分解物を明記すべきである。
- (v) 動物における代謝試験の実施中、申請者は、MRL/許容値又は食事リスク評価の目的のために定義される残留物を効率的に抽出するための分析法(規制施行及びデータ収集)の能力に関して、生じる可能性のある問題を念頭におく必要がある。好ましくは、肝臓及び乳の試料を用いるべきであるが、特定の代謝物が特定の臓器に蓄積する場合、当該臓器の試料も保存すべきである。従って、放射性標識された試料は、後に開発される分析法による将来の分析(分析法の「ラジオバリデーション」と呼ばれることがある)のために保存する必要があると考えられる。しかし、分析法の抽出手順が放射性標識試験で用いられたものと同じである場合、そのようなラジオバリデーションデータは一般に必要ないと思われる。フルデータパッケージのカバーレター又は要約に、このデータの所在を記載すべきである。

概要/緒言

- (i) 試験の目的、用いられた試験方針及びそれらの方針を選択した根拠を含めること。
- (ii) 用いられた実験手順全般、該当する場合は、遭遇した稀な実験上の問題についての考察、計画された試験プロトコルからの逸脱を招いたこれらの問題を軽減するためになされた試み、及び、もしあれば、これらの逸脱が試験結果に及ぼした影響について含めること。
- (iii) 最末残留物のすべての主要成分の同定及び定量(遊離型及び非抽出型の両方)及びこれら成分の可食動物組織及び臓器内での分布の完全な説明を含む、観察された代謝の様式及び経路。
- (iv) 分析された組織並びに乳及び卵中の最終残留物の質的定性に関する結論を含めるべきである。

- (v) 規制施行のための分析法が開発されている場合、動物代謝試験で得られた放射性標識試料を用いて当該分析法の妥当性評価を行い、遊離型、非抽出型／結合型に関わらず、同定された最終残留物の主要成分及び懸念残留物 (residue of concern: ROC) のすべての成分を測定する性能に関して陳述を添付すべきである。陳述には、用いた分析法の検出限界、精度、精確さも示すべきである。指定された陳述／情報が別の場所で提示されている場合、当該セクションで再掲する必要はないが、参照とすべきである。

材料／方法

a) 有効成分

- (i) 被験農薬の有効成分 active ingredient (a.i.) の同定、化学名 (一般名、米国規格協会 American National Standards Institute (ANSI)、British Standards Institution 英国規格協会 (BSI) 又は国際標準化機構 International Standards Organization (ISO) の名称)、企業の開発名／実験名、及び化学情報検索サービス機関 Chemical Abstracts Service (CAS) 番号及び IUPAC が含まれる。化学的純度及び放射化学的純度の証明書を添付すべきである。
- (ii) 残留物を構成する親化合物及び代謝物の化学構造を添付し、そして、すべての異なる開発名又は実験名の相互参照は、概要書又は研究の付属文書のいずれかとして、添付すべきである。同定過程に於いて使用した標準物質の純度及び同一性を記載した分析証明書があれば添付すべきである。
- (iii) 補助資料として関連する製剤パラメーターに関する情報 (例えば、放射性標識された農薬に使用された溶媒、担体又はマトリックスの性質など)。
- (iv) 放射標識被験物質について、放射化学的純度、放射性標識の性質及びその供給元を報告する。放射性標識された被験物質由来の不純物がある場合は、その同定についても報告すべきである。放射性標識被験物質の分子内の標識位置を記載すべきである。¹⁴C 以外の放射性標識の選択についての根拠及び分子内の標識位置 (可能であれば、環の位置に標識するようにする) についての根拠を示す。
- (v) 比放射能に関しては、試料計算で MBq/mg として報告し、分析者が実験データからどのように放射能濃度 (mg/kg) を導いたかを示すべきである。関連する規制当局が、組織及び臓器、並びに各種クロマトグラフィー画分について報告された濃度を確認できるようにするために、放射能カウントに関する十分な情報を提示すべきである。
- (vi) 申請者が、物理／化学的性質 (例: 溶解性など) などの被験物質の完全かつ詳細な説明に適切でありかつ関係すると考えるすべての追加情報。

b) 試験条件及び動物の健康状態

- (i) 試験に用いた試験環境全般 (飼育条件など) の詳細な説明。
- (ii) 供試動物の成長段階及び／又は齢。
- (iii) 試験中の動物の健康状態に関する説明; 試験中に観察された動物の健康状態の変化; 特に実験動物を用いた試験でこのような所見が報告されている場合は、動物の肝臓及び腎臓における変化／所見。皮膚適用では、皮膚の水和度を記録し報告すべきである。

- (iv) 体重及び卵／乳生産量。
 - (v) 報告された試験条件が、家畜への施用において予想される実施条件を代表していないか又は著しく異なる場合、申請者によるその説明又は根拠。
- c) 代表的な動物試料の採取**
- (i) 規定の動物以外の供試動物を選択した場合、申請者によるその根拠又は陳述。当該セクションでは、反芻動物又は家禽のいずれかを対象とした代謝試験が実施されなかった根拠又は陳述を示すべきである。
 - (ii) 採取し、放射性残留物の測定に供し、TRR のさらなる分析及び同定に用いた特定の動物部位の同定。
 - (iii) 申請者が実験の完全かつ詳細な説明に適切であり関係すると考えるすべての追加情報。
 - (iv) 各動物画分(肉、乳、卵、内臓、脂肪、排泄物など)の採取方法。
- d) 農薬の投与**
- (i) 放射性標識農薬を供試動物に投与するための媒体(即ち、飼料への散布、皮膚適用農薬に用いた市販の製剤など)を含む、用いた農薬の投与方法(即ち、投薬銃による投与、飼料への適用、皮膚適用など)の詳細。
 - (ii) 試験に用いた実際の投与量(mg/kg 体重(bw))。この情報は、動物飼料中の予想される1倍濃度に関係すべきであり、乾燥重量ベースで表されるか、動物への施用有効成分の最大濃度としてmg/kg bw で表すべきである。
 - (iii) 投与回数及び投与時期、投与又は施用間隔、施用回数及び屠殺時期。
- e) 屠殺時期**
- (i) 利用可能な動態情報及び一般的な屠殺間隔は、屠殺時期を決める際に利用可能な2つの要素がある。屠殺時期は、優先的に最終投与後6～12時間とすべきである。しかし、いずれの場合も24時間を超えるべきではない。屠殺時期の正当性を示す科学的根拠を提示すべきである。
 - (ii) いかなる屠殺時点においても、包括的な代謝物の同定／特徴付けに十分な放射性物質の実試料が得られるようにすべきである。選択された屠殺時期における放射性物質の量が十分ではないと予測される場合、適切な屠殺時期の前提条件として、最大組織負荷量の判断は、動態実験から決定することができる。放射能が中心コンパートメント(血液)と末梢コンパートメント(臓器、組織)間で速やかに分布すると仮定すると、組織中最大負荷量は、ほとんどの場合、血清又は血中濃度のピーク(C_{max})時点付近である。

この情報は、実験過程において試験動物から直接得ることができる。血液動態を決定するために、最初の投与後のある時点で、血液試料(例えば、耳静脈などから)を採取してもよい。得られた曲線から、投与後の様々な時点での予想組織中濃度を導くことが可能である。また、多くの場合、経口投与された農薬の体内動態の挙動は、ラット、反芻動物及び大部分の家禽で同様であることが経験により示されている。このような推定を行う際は、データは、相対成長係数によって調整されるべきである。従って、最大血中濃度(C_{max})に達する時間を決定する別の方法として、承認されたガイドラインに従って開発され、毒性データセットの一環として提出されたラット体内動態試験の情報が用いられる。この試験からは、多くの場合、経口投与後の血漿中の総放射能に関する必要量の詳細な情報及び体内動態の挙動の説明が得られる。さらに、これらの試験には、定量的又は定性的全身オートラジオグラフィ試験で得られた組織及び臓器間の放射能の分布に関する情報が含まれている場合もある。残留の定義における未変化の親化合物の寄与が過大評価されるのを避けるため、 C_{max} に達する前に動物を屠殺すべきではない。典型的な屠殺時期が、 C_{max} に達する時間よりも十分に長い場合は、屠殺時期を遅らせてもよい(ただし、最終投与の24時間を超えてはならない)。

- (iii) 最後に、動態情報は、懸念される残留物中に含まれる代謝物が、実際に最終代謝物であるという保証を提供できることにも言及すべきである。
- (iv) 屠殺時期の根拠を示す必要がある。一般的な屠殺間隔の考慮事項とは別に、これは試験動物自体から、又は毒性に関するデータ要求を満たすために提出されたラット代謝試験のいずれかから得られた動態情報の要約であるべきである。利用可能な情報の要約を提示すべきであり、補足情報を付録として提出することができる。承認されたプロトコルからの投与量又はその他関連事項の有意な逸脱については、申請者による説明又は根拠を提供すべきである。

f) 試料の取り扱い及び保存安定性(追加情報は、残留化学物質試験の概要に関する OECD ガイドンス文書に記載されている)。報告書には以下の情報を記載すべきである。

- (i) 採取した試料の取り扱い、該当する場合は、送付前の保管、送付方法に関する詳細。
- (ii) 試験室での採取試料を受領した後の試料の保存条件及び保存期間に関する詳細。
- (iii) 残留物の同定前の抽出物の保存条件及び保存期間に関する詳細。

g) 放射性残留物の分析に用いた分析法

- (i) 申請者は、遊離型、抱合型又は非抽出性かにかかわらず、残留物の成分を測定するために、代謝試験で用いた分析法の性能を明示すべきである。
- (ii) 採取した動物部位中の回収された総放射能の定量及び分布に関する分析法は、記述、表形式、又は図として提示すべきである。
- (iii) 酸化燃焼/液体シンチレーション分析前の試料調製に関する詳細な説明。

- (iv) 投与動物から回収された総放射能の大部分の定量的な説明能力。
- (v) 各試料中の総放射能の測定に用いた装置の説明を含む分析法パラメーターの詳細。
- (vi) 計数時間、記録された総 dpm、検出された当量濃度、感度、及び代表的計算例を含む検出限界を含む、選択された代表試料に関する放射能計数データの詳細。
- (vii) クエンチング補正(自動又は手動)を用いた放射能分析法は、クエンチング補正方法を説明し、クエンチングの低減に適用した方法を報告すべきである。

h) 放射能の抽出及び分画

- (i) 使用された抽出溶媒(極性対非極性)及び追加の手法(即ち、脱錯体化試薬、超音波処理など)の使用を含む、採用された抽出操作(即ち、混合、浸出、分配、ソックスレー)に関する選択及び抽出手順についての考察及び根拠。
- (ii) 組織及び/又は水溶性抽出物の抽出後のろ過板又は抽出残渣などの試料から、抱合された残留物を遊離するための、酸、アルカリ及び/又は酵素による加水分解に用いられた条件の説明。加水分解に用いたすべての酵素調製物の供給元、純度、特異性及び活性に関する特定の情報。
- (iii) 各抽出された試料マトリックス中の総遊離型対抱合型の親化合物及び/又は代謝物の比率及び/又は量の算出。
- (iv) 申請者は、徹底的な溶媒抽出及び加水分解処理の両方に続いて、抽出された試料マトリックスに残っている残留放射能(即ち、非抽出性)の定量的な推定値を提示すべきである。報告された残留放射能は、回収された総放射能の割合(%)及び濃度(親化合物相当量)の両方で表すべきである。申請者は、非抽出性放射能標識を遊離する試みについても報告し、その使用に関する根拠を示すべきである。
- (v) 放射性化学物質抽出効率は、採取したすべての動物組織について計算し報告すること。
- (vi) 分画及び単離手順のその後の各段階における放射能の損失の説明又は追跡のためのデータ、及びこれらの損失を最小限に抑えるため申請者が講じた措置について考察すべきである。
- (vii) 申請者は、動物組織中のタンパク、脂肪などに取り込まれた非抽出性又は結合放射能の分画に関する詳細な手順を報告すべきである。
- (viii) そして、申請者は、非抽出性として特徴付けられた元の放射性残留物の有意な量が天然生成物中に取り込まれたかどうかを報告すべきである。
- (ix) 各試料画分(即ち、水溶性、有機溶媒可溶性、加水分解による遊離など)中の放射エネルギーを定量し、総放射能カウント、及び分析された元の試料マトリックス中で回収された総放射能の割合(%)及び mg/kg(親化合物相当量)の両方で報告すべきである。

i) 放射能の特徴付け及び／又は同定

- (i) 未知の試料代謝物の特徴付け及び／又は同定を容易にするために用いたすべての既知の代謝物及び提案される親化合物の中間体(モデル化合物、その構造及び純度を含む)に関する完全な一覧表及び説明。
- (ii) TLC ラジオオートグラム上の試料及び参照 Rf 値、及び GC 及び HPLC カラム上の相対保持時間の算出及びデータ。その後のクロマトグラフィー分析における分析成分(試料)間の試料分離の損失を含む予測値からの予期しない逸脱及び変動を報告し、これらの問題を修正するために取られた措置について考察すべきである。
- (iii) 同定の根拠となった TLC プレート、オートラジオグラム、又は他の適切なイメージングシステムからの出力の画像(又は放射能イメージング検出)。試料又は複製試料の質量スペクトルスキャンなどを含む HPLC/GLC クロマトグラムも提出すべきである。用いたクロマトグラフィーの手法にかかわらず、分析標準物質の挙動を示すクロマトグラムも報告書に添付すべきである。
- (iv) 代謝物の分離及び特徴付け／同定に使用された追加の確認分析手順(即ち、高電圧電気泳動、イオン交換又は排除クロマトグラフィー、誘導体化など)及び代謝物の最終的な同定に用いた決定方法(即ち、質量分析法など)に関する完全な説明。
- (v) 放射性残留物の分離、特徴付け及び同定に用いた装置の操作条件を含む、使用されたすべての装置、機器及び試薬の完全な説明。
- (vi) 採取したすべての試料の各抽出物又は画分において、損失又は説明されなかったすべての放射能について説明すべきである。報告された量は、分析した特定の動物部位又は画分から回収した総放射能の割合(%)及び濃度(親化合物相当量 mg/kg)の両方で表されるべきである。
- (vii) 動物の可食臓器及び組織中の親農薬に由来する抱合体又は複合体非抽出性化学種を化学的に特徴付け／同定するためになされた試みに関するデータ／情報の報告。
- (viii) すべての放射能は、以下のいずれかとして報告すべきである。
 1. 遊離代謝物 – 遊離に化学的処理を必要とせず、通常、有機溶媒によって抽出可能。
 2. 抱合代謝物 – 抱合体は、エキソコン exocon と呼ばれる農薬由来のものとエンドコン endocon と呼ばれる動物由来のものとの2つの部分からなる。エンドコンは、グルクロン酸であることが多いが、硫酸、アミノ酸、グルタチオンなどの他の可能性もある。通常、エキソコンの同定は、抱合結合の開裂なしには不可能である。開裂は、通常、酸、塩基又は酵素による加水分解によって行う。加水分解後、農薬又は農薬代謝物には抱合構造部分がなく、通常、有機溶媒に溶解する。
 3. 非抽出性放射能標識 – 即ち、極性及び非極性溶媒による過酷な抽出によってもマトリックスから取り除くことができない生成物を生じる、細胞成分と共有結合している代謝物。これらの残留物が化学的(例えば、酸、塩基又は酵素による加水分解など)に取り除かれる場合、非抽出性残留物のサブクラスを設定すべきである。

4. 天然成分 – 小さな断片に分解され、同化サイクルに入り、細胞成分に取り込まれた農薬に適用される。天然成分が非抽出性の場合、それらは結合代謝物と区別することは困難である。これにより、当該残留物が全く残留農薬ではない場合でも、これらの残留物を結合残留農薬と誤分類する可能性がある。特に放射性残留物が最終放射能の大部分を占めると考えられる場合、当該残留物が天然成分であることを確かめることが望ましい。

- (ix) 申請者が、家畜代謝試験の実施及び TRR の決定の完全かつ詳細な説明をするために適切であり関連性があると考えられるすべての追加情報。

結果及び考察

- (i) 試験方針 報告書のこの部分には、遭遇した予期せぬ実験上の問題又は条件の結果として意図した試験プロトコル又は方針からの逸脱に関する考察を含むべきである。これらには、残留物の抽出、分画及び特徴付けにおける問題、及び該当する場合は、非抽出性又は結合残留物に用いた特殊な抽出及び特徴付けの方針などが含まれる。これらの逸脱が試験結果に影響を及ぼす場合は、その影響又は効果についての考察を含むべきである。
- (ii) 代謝経路 可能であれば、動物で観察された分解経路又は代謝経路のフローチャート形式を伴う詳細な考察。考察の目的のために、家畜代謝試験の実施時に利用可能であれば、対象化学物質を用いて実施されたラット代謝試験で得られた結果及び植物代謝試験で観察された結果と、組織で観察された代謝経路とを比較及び対比させてもよい。特徴付け及び／又は同定試験の結果に基づき、関連する化学構造及び名称 (CAS 番号を含む利用可能な CAS 及び IUPAC 名) の表とともに代謝経路の化学的定義を提案すべきである。推定された(しかし同定されていない)中間体／代謝物も、代謝経路に明記すべきである。

(iii) TRR の特徴付け及び／又は同定及び分布

1. 表又はグラフ形式を使用する。TRR のすべての主要成分(遊離体と抱合体の両方及び非抽出性成分)を同定し、名称、構造及び量(TRR の割合(%))及び親化合物相当量濃度の両方で表す)を含めて、各動物画分内のそれらの分布を報告する。すべての放射能は、遊離型、抱合型又は非抽出性代謝物あるいは天然成分として報告すべきである。
 2. 申請者は、最終残留物のすべての有意な同定できない及び／又は特徴付けできない成分、それらの量及びすべての動物画分内の分布について、可能な限り多くの情報を提示すべきである。
 3. 統計的処理。家畜代謝試験の過程において、サンプリング／分析中に得られた生データに適用された統計的試験の代表的例を含めること。放射能測定及びクロマトグラフィー分離の LOQ を示すこと。
- (iv) 申請者が、家畜代謝試験の完全かつ詳細な説明を提供するために適切かつ関連していると考えられる、試験のすべての面の妥当性を保証するために講じられた精度管理についての措置／注意事項などを含むすべての追加情報。

結論

- (i) 動物において観察された代謝の経路、関与する機序及び範囲又は程度。
- (ii) 採取された組織、卵及び乳中の試料採取時の TRR の性質、量及び分布。
- (iii) 放射性標識された動物試料について実施された試験結果に基づき、抽出効率、遊離型か非抽出性／抱合型かにかかわらず、最終残留物の同定された成分を測定するために開発された及び利用可能な規制施行のための分析法の能力、及び動物組織、乳又は卵中で遊離型か非抽出性／抱合型かにかかわらず、懸念残留物 (residue of concern: ROC) の全成分を測定するための同じ分析法又は修正された分析法の能力を証明する。
- (iv) 申請者が、家畜中の体内動態及び代謝経路の完全かつ詳細な理解のために、適切であり関係すると考えるすべての結論。

表／図

(i) 表(例)

1. 試験で用いたすべての参照標準及び代謝物の名称、構造、純度。
2. 親化合物、代謝物、関連化合物及びモデル化合物についての適用されたクロマトグラフィー条件下での HPLC/GLC の保持時間及び TLC の R_f 値。
3. 乳、卵、可食組織及び臓器内での最終残留物中の有意であるが同定されていないすべての化合物の性質、特性、量及び分布。

(ii) 図(例)

1. 分析された各試料マトリックスに用いられた全般的な抽出及び分画方針又はスキーム。
2. 様々なイオン交換(排除)又は分取 HPLC/GLC における放射能の分布。
3. 代謝経路のフロー図又はフローチャート

参考資料

付録

- (i) 代表的なクロマトグラム、スペクトルなど(該当する場合)。
- (ii) 用いられた補足動態情報を含む報告書。
- (iii) その他。本報告書の他のいかなるセクションにも該当しない関連資料。

試験報告書

62. 以下のセクションは、試験報告書にすべての関連情報が含まれていることを確認するチェックリストとして用いることができる。

- 被験物質である農薬の有効成分 active ingredient (a.i.) の化学名を含む識別情報：一般名 (米国規格協会 (American National Standards Institute : ANSI)、英国規格協会 (British Standards Institution : BSI) 又は国際標準化機構 (International Standards Organization : ISO) 名) ; 企業の開発名 / 実験名 ; CAS 番号及び IUPAC 化学名。
- 放射性標識された有効成分及び放射能標識位置の正当性についての説明、放射化学的純度、放射性標識の性質、比放射能 (MBq/mg として報告)、供給元、有意な放射性標識された不純物が存在する場合はその同定。
- 試験で用いた参照標準及び代謝物の名称、構造及び純度。
- 試験に用いた試験環境全般 (即ち、動物の飼育条件など) の詳細。
- 選択された動物の説明 (品種、齢、成長段階、健康状態) 及び規定されたもの以外の試験動物の選択に関する根拠。
- 用いた農薬の投与方法 (皮膚適用、投薬銃など)、製剤、実際の投与量 (mg/kg 体重) 及び各用量における放射性標識農薬及び非標識農薬の実際の量、投与回数及び投与時期並びに投与間隔、最終投与から屠殺までの時間及びその期間の根拠に関する説明。
- 屠殺前に採取した試料の種類及びこれら試料 (尿、糞、卵、乳) の取り扱い及び保存に関する説明。
- 試験室で調製するまでの試料の取り扱い及び保存に関する詳細を含む、屠殺時に採取した試料の説明。
- TRR 測定のための動物組織、卵、乳及びその他の試料 (糞、ケージ洗浄液) の調製及び分析の詳細。
- 様々な動物マトリックス中の放射能の抽出及び分画に関する慎重かつ完全な説明、各試料画分中の放射能の量に関する報告書を含み、分析された元の試料マトリックス中の総放射能カウント並びに割合 (%) 及び濃度 (mg/kg 親化合物相当量) の両方で定量された、抽出後の固体中の残留放射能を含む。
- 放射性残留物の分離、特徴付け及び同定に用いた装置の操作条件を含む、使用されたすべての装置、機器及び試薬の完全な説明。
- 放射性残留物の特徴付け及び / 又は同定、すべての主要成分 (遊離型、抱合型、非抽出性又は天然成分にかかわらず) についてのデータを含み、組織、卵又は乳中でのそれらの存在を TRR の割合 (%TRR) 及び濃度 (mg/kg) の両方として表す。

- 動物マトリックス、親化合物、代謝物及び参照標準の抽出物中の放射性残留物のクロマトグラフィー挙動(HPLC 及び/又は GLC の保持時間、TLC の Rf 値)及び分光学的挙動(MS イオン及びアバンドンス)の詳細。
- 様々な動物マトリックス中の TRR のすべての主要成分の保存安定性に関する情報。
- 使用した抽出方法による動物組織、乳及び卵からの放射性残留物の回収率に関する定量的情報、特に規制施行分析法に係る(可能性のある)場合。
- 他の家畜代謝試験、ラット及び植物代謝試験で観察された代謝/分解との比較を含む(家畜代謝試験の実施時にこれらのデータが利用可能である場合)、動物において観察された分解又は代謝のルート(代謝経路を伴う)詳細な考察。
- 以下についての結論: (a) 動物において観察された代謝経路及び代謝の程度、(b) 動物組織、乳及び卵における TRR の性質、量及び分布、及び (c) 動物組織、乳及び/又は卵について、利用可能な施行分析法が、残留の定義の同定された成分を抽出/遊離する能力の程度を示すために実施した妥当性評価試験の結果。

参考文献

本ガイドラインは、以下の文書を参考資料としている。

- (1) OECD Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies (2006)
- (2) OECD Guidance Document on the Definition of Residue (2006)
- (3) Commission of the European Communities (1997). Document 7030/VI/95 - Rev.3 (22/7/1997); Appendix F: Metabolism and Distribution in Domestic Animals.
- (4) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2002). Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed. Rome.
- (5) Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) (1996). Guidelines on Pesticide Residue Trials to Provide Data for the Registration of Pesticides and the Establishment of Maximum Residue Limits, Section 2.1 Radiolabelled Studies (Metabolism Studies). Rome.

資料⑦: Guidelines on Performance Criteria for
Methods of Analysis for the Determination of
Pesticide Residues in Food and Feed CAC/GL
90-2017

食品及び飼料中残留農薬の定量分析法のための性能基準に関するガイドライン

CAC/GL 90-2017

2017年採択

本文書は、2017年7月の第40回コーデックス委員会で採択されたガイドラインである。また、原文は下記のタイトルで、英語で公表されたものである。

GUIDELINES ON PERFORMANCE CRITERIA FOR METHODS OF ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN FOOD AND FEED CAC/GL 90-2007

<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>

本翻訳は仮訳であり、正式あるいは公認されたものではありません。利用される場合は、必要に応じ原文を参照ください。原文と翻訳版との間に相違がある場合は、原文が優先されます。

注) 下線は、「Draft Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food (At Step 6), Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, July 2016」からの主な変更部分を示した。

目的

1. これらのガイドラインの目的は、食品及び飼料（以下「食品」という。）中の残留農薬分析法が適合すべき性能基準を規定し、明記することである。本文書では、意図する使用目的に合致し、国内のモニタリング及び／又は国際貿易の場で残留農薬を確実に評価するために用いられる分析法に対して、科学的に許容される信頼性を与える特性・パラメータを取り扱う。
2. 本文書は、残留の定義に基づく全ての食品中の対象化合物を分析する個別残留分析法及び多成分残留分析法（Multi-Residue Methods: MRM）のいずれにも適用可能である。
3. これらのガイドラインは、それぞれ独自の分析法の性能基準を有する定性分析及び定量分析を取り扱う。分析対象化合物の同定及び確認のための分析法に関する性能基準についても取り扱う。

分析法の選択及び妥当性評価に関する原則

A. 分析法の目的及び適用範囲の規定

4. 分析法の使用目的は、通常、適用範囲の文書中に記載されており、分析対象化合物（残留物）、マトリックス及び濃度範囲にいて規定される。また、その目的がスクリーニング、定量、同定及び／又は結果の確認なのかについても言及する。
5. 規制用途においては、最大残留基準値（Maximum Residue Limit: MRL）は、残留の定義の観点から表される。残留分析法は残留の定義の全成分について測定可能であることが望ましい。
6. 目的適合性は、技術及びリソースの制約の範囲内において、分析法の性能がエンドユーザーのニーズに適合する度合い、及び試験室とエンドユーザー（又は依頼主）との間でデータに関し合意された基準（データ品質目標）に一致する度合いである。目的適合性の基準は、本文書に記載の特性に基づくことも可能ではあるが、最終的には許容される合成不確かさとして表される¹。
7. 分析法の選択は分析対象化合物及び分析の意図する目的²に基づく。

B. 他のコーデックス委員会ガイドラインの補完

8. コーデックス委員会（Codex Alimentarius Commission: CAC）は、輸出入する食品の検査に関わる試験室のためのガイドライン³を発行しており、試験室に対し次のように勧告している。
 - (a) 「化学分析試験室の内部精度管理に関するハーモナイズドガイドライン（Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories）」に記載されているような内部精度管理手順を用いること
 - (b) 「（化学）分析試験室の技能試験に関する国際的なハーモナイズドプロトコル（The International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories）（Pure Appl. Chem., vol 78, No. 1, pp.145-186, 2006）」に記載の要求事項に合致した食品分析に関する適切な技能試験に参加すること
 - (c) 可能な限り、CAC が提示した原則に基づき妥当性が確認された分析法を用いること
9. 分析法は、文書において上記の品質保証（Quality Assurance: QA）及び精度管理（Quality Control: QC）に関する原則が一貫されるよう国際的に許容され、認可され、周知された試験室の品質マネジメントシステム（Quality Management System）⁴の範囲内で用いられるべきである。

¹ IUPAC 単一試験室における分析法の妥当性評価に関するハーモナイズドガイドライン（Harmonized IUPAC Guidelines For Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis）、Pure & Appl. Chem., 74(5), 2002; 835 – 855

² OECD 残留農薬分析法に関するガイダンス文書（OECD Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods）、ENV/JM/MONO (2007)17

³ 食品の輸出入規制にかかわる試験室の能力評価に関するガイドライン（Guidelines for the Assessment of the Competence of Testing Laboratories Involved in the Import and Export Control of Food）、CAC/GL 27-1997

⁴ 試験室及び較正機関の能力に関する一般要求事項（General requirements for the competence of testing and calibration laboratories）、ISO/IEC 17025 (2005)

C. 分析法の妥当性評価

10. 分析法の妥当性評価は、分析法が目的適合性を有していることを証明するためのプロセスである。つまり、試験が、適切に訓練された分析者によって特定の機器及び材料を用い、分析法のプロトコルに忠実に従って実施されているとき、試料分析に関する指定された統計的な限度内において精確で、信頼性がありかつ一貫した結果が得られることを意味する。妥当性評価では、マトリックス効果を考慮して分析対象化合物の同一性及び濃度を実証し、回収率の統計学的特性を提示し、偽陽性率及び偽陰性率が許容されるかを示すべきである。分析法が適切な分析標準物質を用いて行なわれている場合には、経験豊富な残留試験室において訓練された分析者により、同一又は同等の試料物質に関して、規定の性能基準内の結果が得られるべきである。分析法の性能が、時間が経過しても適切であることを保証するため、分析法の妥当性評価を継続的に評価（例：添加回収）すべきである。

分析法の性能パラメータ

11. 分析法の個々の性能基準に関する一般要求事項を以下にまとめる¹⁵。

A. 分析法の文書 Method Documentation

12. 妥当性評価後、分析法の文書には、性能基準（データ品質目標）に加え、次の情報を記載することが望ましい。

- (a) 残留の定義に含まれる分析対象化合物の本質
- (b) 妥当性評価によってカバーされる濃度範囲
- (c) 妥当性評価に使用されるマトリックス（代表的な食品カテゴリー、例：水分、脂肪及び糖含有量、pHを含む特性に基づく類似の農産物）
- (d) 機器、試薬、許容変動を含む段階を追った詳細な操作手順（例：100 ± 5 °C で 30 ± 5 分間加熱する）、較正及び精度管理手順、必要とされる特別な安全注意事項、意図される用途及び不確かさに関する必須要件を記したプロトコル
- (e) 分析法に関する拡張測定不確かさ（Measurement Uncertainty: MU）の定量結果は、必要に応じて妥当性評価の手順で計算し、報告することが望ましい。

B. 選択性 Selectivity

13. 理想的には、選択性を評価して、有意に悪影響を及ぼす妨害が起こらないことを実証すべきである。あらゆる潜在的な妨害成分に対して分析法を試験することは非現実的であるが、試薬のバッチごとに試薬（工程）ブランクを分析することによって共通の妨害を確認することが必要である。試薬及び/又は溶媒が試料のバッチ間で変更される場合は、追加の試薬ブランクの評価を実施することができる。試薬ブランクでは、可塑剤、セプタムブリード、洗浄剤、試薬不純物、試験室汚染、キャリアオーバーなどのバックグラウンドレベルが出現しやすく、分析者はこれらの出現を認識しなくてはならない。また、分析対象化合物どうしの干渉についても、混合標準溶液中で個々の分析対象化合物を確認することにより知る必要がある。マトリックス干渉は、分析対象化合物が含まれていないことが明らかな試料（試料の各バッチでマトリックスブランクが必要とされる）の分析により評価されるか、又は定量に標準添加法が採用される（セクション E 参照）。

14. 一般的な原則として、妨害が分析法の性能に全く影響を与えないような選択性が必要である。選択性の最終的な試験には、分析における偽陽性率及び偽陰性率が含まれる。分析法の妥当性評価中の偽陽性率及び偽陰性率を推定するには、マトリックス [同じソースからではない] 毎に適切な数のブランクを、分析対象化合物の報告レベルで添加されたマトリックスとともに分析すべきである。

⁵ OECD 単一試験室における定量分析法の妥当性評価に関するガイダンス文書—植物防疫剤及び殺生物剤の登録前及び登録後データ要求の補助に係るガイダンス（OECD Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Method-Guidance used in support of pre-and post-registration data requirements for plant protection and biocidal products） ENV/JM/MONO(2014)20

C. 較正 Calibration

15. 検量線用物質の調製における誤差を除き、通常、較正誤差が全不確かさに占める部分はわずかであり、その他に分類することは問題ない。例えば、較正による偶然誤差は不確かさの一部であるが、系統誤差は分析のバイアスを生じる。一方で、妥当性評価や分析中の精度管理では、両誤差ともひとつの誤差として評価される。それでもなお、較正にはいくつかの特性があり、これらの特性は最終プロトコルの最適化に影響するため、分析法の妥当性評価の開始にあたり知っていることが有用である。例えば、検量線が直線か二次曲線か、原点を通過しているか、試料マトリックスの影響を受けているかどうかなどを前もって知る必要がある。本文書に記載のガイドラインは妥当性評価に関するものであり、日常分析で行われる較正よりも詳細に述べられている。

16. 不確かさの実験的推定には反復測定が必要である。初回の分析法の妥当性評価では下記の較正手順が推奨される。

- a. 5 濃度以上の測定を行う事が望ましい（濃度毎に複数回注入を考慮する）。
- b. 参照標準は対象とする濃度範囲において均等に配置されるのが望ましく、較正範囲は実際に遭遇する可能性のある全濃度範囲を包含することが望ましい。
- c. 全シーケンスにわたり較正の一貫性が保たれていることを示すため、参照標準をシーケンス全体にわたって分散するか、又は分析ランの最初と最後に含めるべきである。較正関数のフィッティングについては、相関係数に頼りすぎることなく、視覚的及び/又は残差（標準の実際の濃度と算出された濃度との差）を算出することによりグラフを作成し検査すべきである。較正曲線の残差が $\pm 20 \sim 30\%$ （装置の LOQ に近い較正濃度では 30%）を超えて外れる場合、外れ値の統計学的考察を行うべきであり、精度管理基準を満たさない場合にはシーケンスの再分析を必要とする場合がある。

D. 直線性 Linearity

17. 直線性は、適切な検量線の濃度に対する応答の線形回帰により生成される残差をプロットすることにより検証可能である。曲線パターンは非線形の較正関数となることからフィッティングの不良を示唆する。この場合、5 濃度以上を用いて二次関数のような他の関数を検討し適用すべきである。現在、フィッティングの質に関する指標として直線性が広く普及しているが、決定係数 (R^2) は高濃度の標準物質に比重が置かれるため、誤りを起こす可能性がある。この場合、相対濃度範囲の潜在的影響を最小にするために、 $1/x$ や $1/x^2$ などの適切な重み付け係数を考慮すべきである。

18. 一般に、ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 未満の低濃度の定量では、線形回帰よりも重み付け線形回帰や重み付け二次関数の使用が推奨される。正当性なしに較正曲線を強制的に原点を通すべきではないが、低濃度での残留濃度の算出において誤差を抑えるため、理想的には切片の値はゼロ付近となるべきである。

E. マトリックス効果 Matrix Effects

19. マトリックスマッチング較正はマトリックス効果を補正するためによく使用されている。ブランクマトリックス（好ましくは試料と同じか又は類似のタイプ）の抽出液を較正に用いるべきである。ガスクロマトグラフィー（GC）分析においてマトリックス効果を補正する他の実用的な方法として、化学成分（アナライトプロテクタント）の使用がある。これは、（理想的には）検量線用溶液と試料抽出液中の農薬の応答を等しく増強するため試料抽出液及び検量線用溶液の両方に添加される。マトリックス効果を補正する他の方法は、標準添加法又は同位体標識化した内標準（IS）、又は化学的同族体の使用である。しかしながら、MRM（多成分残留分析法）ではこれらの方法が困難な場合が多い。これは、異なるマトリックス中に異なる濃度で含まれる残留物が多すぎると日常分析手順を構築できず、また、このような多数の分析対象化合物に対する同位体標識標準物質もないからである。理想的には、同位体標識された標準が利用可能である場合、そのような標準は対象化合物の範囲を代表すべきであり、回収率は同位体標識されていない標準を添加した試料の場合の基準内に収まるべきである。溶媒のみの検量線を用いる場合、結果の同等性を示すために、マトリックスマッチ標準液と溶媒標準液の応答を比較することによって、マトリックス効果の測定を行わなければならない。

F. 真度及び回収率 Trueness and Recovery

20. 真度とは、試験結果と測定対象成分の採択された参照値との間の一致の程度をいう。真度は「バイアス」として定量的に示され、バイアスが小さいほど真度が優れていることを示す。バイアスは一般に、認証（利用可能な場合）標準物質に対する分析法の応答とその物質に付与された既知の値とを比較することにより決定される。理想的には多機関試験が望ましい。参照値において不確かさが無視できない場合には、結果の評価では標準物質の分析で生じる統計的ばらつきと同様に、標準物質の不確かさについても考慮すべきである。認証標準物質¹⁵がない場合、ガイドラインでは妥当性評価試験の目的で十分に特徴付けられた入手可能な標準物質の使用を推奨する。

21. 回収率とは、分析対象化合物を抽出前に試料（通常はブランク）に添加し、最終的に定量された値を添加量と比較した比率をいい、一般に百分率で表される。測定時の誤差は、バイアスのかかった回収率につながり、最終抽出液における真の回収率から逸脱する。日常の回収率は、試料のバッチごとの分析における精度管理スパイクで行われた測定を参考にする。

G. 精度 Precision

22. 精度とは、規定された条件下で得られた独立した（反復）試験間の結果の一致の程度をいう。通常、標準偏差（Standard Deviation: SD）又は変動係数（Coefficient of Variation: CV）としても知られる相対標準偏差（Relative Standard Deviation: RSD）として求められる。精度とバイアスの区別は分析系をどの段階で見るとによる。従って、単一測定の観点からは、分析で用いられる較正に影響するどのような偏りもバイアスとみられるであろう。年間を通した分析を検討する分析者の観点からは、分析のバイアスは毎日異なり、関連する精度とともに確率変数のように振る舞うはずであり、この精度の推定には規定された条件をすべて取り入れるべきである。

23. 単一試験室の妥当性評価については、(a) 繰返し性（併行精度）（同一のシーケンス内での測定のばらつき）、及び (b) 室内精度（同一試料の複数のセット間の結果のばらつき）の 2 種類の精度条件が関係する。精度の値は、起こり得る試験条件を代表していることが重要である。まず、分析ラン間の条件の変動は、分析法の日常的な使用中に試験室において通常起こるであろうことを代表しているべきである。これは継続中の分析法の性能の妥当性評価/検証試験によって実施可能である。例えば、試薬バッチ、分析者及び機器の変動は、継続中の精度管理で測定すべきである。次に、使用される試験材料は、マトリックスや（理想的には）粉碎状態の点から、実際に適用する際に遭遇する可能性のある材料を代表するものであるべきである。

24. 単一試験室の妥当性評価では、精度は分析対象化合物の濃度によって変わることが多い。典型的な仮定としては、(a) 精度は分析対象化合物の濃度によって変化しない、又は (b) 標準偏差は分析対象化合物の濃度に対し比例（又は直線的に依存）する。いずれの場合も、分析対象化合物の濃度の大きな変動が予想される場合は（すなわち分析対象化合物の濃度が LOQ に近づくとき）これらの仮定を検証する必要がある。

25. 精度データは、ここで示された最小限の繰返し性（併行精度）や分析ラン間の条件に加え、非常に多様な条件について得られる場合があり、追加情報を取得することが適切である。例えば、結果の評価や測定の向上には、日間や日内の別々のオペレータ及びラン効果に関する指標、あるいは 1 台又は数台の機器を用いて達成可能な精度に関する指標を有することは有用であろう。様々な試験デザインや統計解析法の使用が可能であり、このような試験では常に慎重な実験デザインを選ぶことが強く推奨される。初回の妥当性評価は、分析法の目標とする定量下限（LOQ）又は報告限界、及び少なくとも 1 つ以上のより高濃度（例えば目標とする LOQ の 2~10 倍又は MRL）で行われるべきである。

H. 定量下限 Limit of Quantification (LOQ)

26. 分析化学者間の長年の定義によると、LOQ は分析におけるシグナル/ノイズ比 (S/N) の平均値が 10 に等しくなる濃度である。実際の LOQ の正確な決定には、添加試料やマトリックスブランクについて多くの分析が必要となるが、LOQ は分析機器やその他多くの要因の性能状態により日差変動があるため、実際のところ LOQ は推定できるに過ぎない。いくつかの妥当性評価ガイドラインでは、LOQ での添加実験により、LOQ が分析法の性能基準を満たしていることを検証することが求められているが、LOQ の日差変動のために分析者は実際の分析法の LOQ よりも大幅に過大な推定をする傾向があり、厳密な LOQ の定義 (S/N = 10) を実行するのは困難である。従って、最低妥当性評価濃度 (Lowest Validated Level : LVL) での添加の方が記述的で適切な方法である。さらに、分析対象化合物の定量は、同じ分析シーケンス内では、LVL より低濃度で行うべきではない。最低較正濃度 (Lowest Calibrated Level : LCL) での S/N は ≥ 10 (濃度 \geq LOQ) でなくてはならず、各分析シーケンスに必要なシステムの適合性確認項目として設定可能である。分析において報告限界 (通常、アクションレベルは \geq LCL である。) が達成されていることを確認するために、精度管理のマトリックススパイクを各シーケンスに含めることもできる。本質的には、妥当性評価のポイントは LOQ を求めることではなく、報告された最低濃度が分析の要求を満たしていることを示すことである。定量には有効ではないが、一部の分析者は、分析対象化合物の濃度を推定するには低すぎる濃度で分析対象化合物の存在を推測するために、検出限界 (LOD) (S/N = 3) を計算することを望む場合もある。

I. 分析範囲 Analytical Range

27. 妥当性評価の範囲は、分析法の妥当性が確認されたとみなされる分析対象化合物濃度の範囲である。LVL は、分析法の性能基準を満たす妥当性評価において評価された最低濃度である。妥当性評価された範囲は、必ずしも装置の検量線の有効範囲と同じである必要はないことを認識することが重要である。検量線は幅広い濃度範囲をカバーすることができるが、妥当性評価された範囲 (通常、不確かさの点でより重要である) は一般的により限定された範囲をカバーする。実際には、大部分の分析法は、2 濃度以上の濃度で妥当性評価が行われている。妥当性評価範囲は、これらの濃度間では適正な外挿とみなすことができるが、多くの試験室では直線性を示すために 3 点目の濃度における妥当性評価を選択している。コーデックス基準に関する残留濃度をモニタリングする場合は、分析法は各分析対象化合物の LVL が現行のコーデックス最大残留基準値 (Codex Maximum Residue Limit: CXL) 以下となるよう十分に感度が高くなくてはならない。妥当性評価範囲は、既存の CXL をカバーすることが望ましい。CXL が存在しない場合は、国の規制当局によって設定された MRL が最低濃度となる。対象となる分析対象化合物/マトリックスの組み合わせに対して CXL や MRL が存在しない場合には、一般に 0.01 mg/kg 又は LOQ (いずれか大きい方) が望ましい LVL となる。MRM では、一般的な分析目標は、様々ではあるが、代表的な食品で LVL (及び報告レベル) を 0.01 mg/kg に設定することである。

J. 堅牢性 Ruggedness

28. 分析法の堅牢性 (頑健性と同義のことが多い) とは、分析手順に記載された実験条件からの逸脱が生じたとき、分析法によって生じる結果の変化に対する抵抗性をいう。実験パラメータの限界を分析法のプロトコルに (以前には必ずしも行われていたわけではないが) 規定すべきであり、許容範囲内の逸脱においては、個別に又は任意の組み合わせによってであれ、生じる結果に意味のある変化をもたらすべきではない。ここで「意味のある変化」とは、分析法が目的への適合性によって定義されるデータの品質目標を満たさないことを意味する。結果に影響を及ぼすと考えられる分析法の側面を特定し、堅牢性試験によりその分析法の性能に対する影響を評価すべきである。

29. 堅牢性試験が対処できる因子の例には、分析機器の小さな変化、試薬のブランド/ロット又は分析者の変更、試薬の濃度、溶液の pH、反応温度、操作終了までの時間及び/又は他の関連因子がある。

K. 測定不確かさ Measurement Uncertainty (MU)

30. 測定不確かさの推定に対する正式なアプローチは、真の値が、定義された確率の範囲内でその付近に存在することが期待できる推定値を、方程式又は数学モデルから算出することである。分析法の妥当性評価に記載されている手順は、結果の推定に用いられる式が、あらゆる種類の偶然誤差に関して適正な許容範囲をもって、すべての認識されかつ有意な影響を包含した妥当な式であることを保証するようデザインされている。測定不確かさに関するさらなる考察及び説明は、「分析結果の不確かさの推定に関するガイドライン (Guidelines on Estimation of Uncertainty of Results) ⁶ に記載されている。

⁶ 分析結果の不確かさの推定 (Estimation of Uncertainty of Results) , [CAC/GL 59-2006](#)

31. 測定の不確かさを濃度の関数として表し、データに関して試験室と依頼者又はエンドユーザーとの間で合意された目的適合性の基準と関数を比較することが望ましい。可能性のひとつとして、MU を技能試験データ⁶から計算することである。

スクリーニング分析法の性能基準

32. スクリーニング分析法は、通常、本質的に定性的又は半定量的であり、その目的は閾値を超える残留物が含まれない（「陰性」）試料を、閾値を超えて残留物を含む（「陽性」）試料を識別することである。従って、その妥当性評価の戦略は、その値を超えていれば結果が「潜在的陽性」となる閾値濃度の設定、統計に基づいた誤検出率（陽性又は陰性）の算出、妨害の検討、適切な使用条件の設定に焦点を合わせることである。スクリーニングの概念は、試料中に存在する可能性が低い分析対象化合物にまで分析の適用範囲を拡張する効果的な方法を試験室に提供することである。より頻繁に出現する分析対象化合物については、妥当性が確認された定量的な MRM を用いて継続的にモニタリングを行うべきである。定量分析法と同様に、スクリーニング分析法の選択性や感度についても確認すべきである。使用目的によっては、市販の検査キットが役に立つかもしれないが、現在の技術は実用面で多成分残留スクリーニングの要求に経済的にみあうものではない。選択性及び分析範囲は、検出前にクロマトグラフィーや他の分離法を用いることにより向上する場合が多い。別のアプローチは、質量分析（Mass Spectrometry: MS）法を用いたスクリーニング分析法を使用することで、これにより特定の化合物を互いに区別することが可能となる。

33. スクリーニング分析法の選択性は、試料物質中に存在すると考えられる他の物質から、対象化合物又は化合物群の存在を区別できなくてはならない。スクリーニング分析法の選択性は、通常、定量分析法の選択性よりも低い。スクリーニング分析法は、化合物群又はクラスに共通の構造がある場合に利用されることができ、化合物を明確に同定できないイムノアッセイ法や分光光度法の応答に基づく場合がある。

34. スクリーニング検出限界（Screening Detection Limit: SDL）に基づくスクリーニング分析法の妥当性評価は、検出能に焦点を当てることができる。各代表的なマトリックスのタイプ（食品グループ）⁷について、最小限の妥当性評価では、推定 SDL で添加された少なくとも 5 試料の分析を行うべきである。試料及び異なる供給源から得た少なくとも 5 個のマトリックスブランク（例：異なる市場又は異なる農場から得られたものなど）。種類や数を増やすことにより妥当性評価の質は向上する。マトリックスの種類ごとに最低 2 つの異なる試料は、試験室が意図する適用範囲に適していることが望ましい。追加の妥当性評価データは、継続中の QC データ及び日常分析の間の分析法の性能検証から収集することができる。定性的スクリーニング法の SDL は、少なくとも 95% の試料（例：5% の許容可能な偽陰性率）で分析対象化合物が検出された（必ずしも MS 同定基準を満たす必要はない）最低濃度である。

定量分析法の性能基準

35. 選択性は、食品中の残留農薬に関する規制管理プログラムで使用される定量分析法の性能基準を定義する際に特に重要である。理想的には、当該分析法は、試料又は試料抽出液中に存在すると考えられる他の分析対象化合物及びマトリックス化合物による干渉を受けないシグナル応答を示す必要がある。完全に分離されていないピークに基づくクロマトグラフィー分析は、信頼性の低い定量結果を示す。クロマトグラフィーによる分離と組み合わせて、元素特異的検出器、異なる検出波長又は特定の化合物や構造を区別するのに優れる MS 検出器を使用することは、定量分析法の選択性を向上させる。

36. 1 回の抽出で様々な残留農薬を回収するという要求は、個別残留分析と比較すると MRM では選択性が低下する可能性を増加させる。選択性の低い抽出法や精製法を用いると、最終抽出液中に共抽出されるマトリックス物質が増える可能性が高くなる。このような共抽出物の性質及び量は、マトリックス、分析法及び目的の分析対象化合物により顕著に変動する可能性がある。従って、定量が化学的干渉を受けないことを確保するために、MRM の精度及び真度に関する基準を設定するときには注意が必要である。

37. 分析法の選択性に加え、分析法が信頼性のある定量結果を与える能力を有することを示さなければならない [即ち、真度 (F 項参照) 及び精度 (G 項参照)]。オリジナル試料と反復試料間の相対標準偏差は、20%未満であることが理想である。

⁷ Table 5, *Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis* (CAC/GL 40-1993)

38. 定量分析法の許容基準は、初回及び継続中の妥当性評価段階のいずれにおいても、各添加濃度において許容される平均回収率を与えることができることを示す必要がある。妥当性評価のために、分析法の目標とする LVL、LOQ 又は報告限界濃度、及びこれより高い少なくとも 1 濃度（例えば、LVL の 2～10 倍又は MRL）で最低 5 試行の繰り返し試験（回収率及び精度を確認するため）が推奨される。分析法が規制対応の試験に用いられている場合（即ち、食品が設定された MRL に準拠している場合）は、MRL（又は CXL）は 妥当性評価された濃度範囲内にあるべきである。残留の定義に 2 種類以上の分析対象化合物が含まれている場合には、すべての分析対象化合物について分析法の妥当性評価を行うべきである。

39. 分析法の真度は、認証標準物質の分析、すでに性能基準が厳密に確立されている他の分析法（一般的には共同試験が行われた分析法）により得られた結果との比較、又は既知のブランク試料に添加された分析対象化合物の回収率を算出することにより求められる。規制目的のための許容される平均回収率は、通常 70～120%（RSD \leq 20%）が望ましい。非常に低い濃度（例：0.01 mg/kg 未満）については、いくつかの試験室では、これらの基準から外れた分析法の性能基準（例：60～120%、RSD $<$ 30%）を受け入れることができる。場合によっては（一般には MRM で）、回収率は低いが一貫している（例：精度が良い）ときなど、この範囲外の回収率が許容されることがある。系統的な低いバイアスの理由が化学的に十分確立している場合（例：分配工程における相間の分析対象化合物の分配が知られている場合）には、この許容がさらに正当化される。しかしながら、可能であればより正確な分析法を使用すべきである。120%を超える回収率は、正の干渉かバイアスによるものと考えられ、これらについて調査すべきである。

40. 分析法の妥当性評価を支持するため、実残留マトリックスの分析が推奨される。回収率の解釈にあたり、試験用試料に添加した分析対象化合物は、生物学的に生じた実際の分析対象化合物（残留農薬）と同じ挙動をしない場合があることを認識する必要がある。多くの場合、抽出された実残留物の量は、実際に存在する実残留物の総量よりも少ない。これは、抽出の際の損失、残留物の細胞内結合、抱合体の存在、又は分析対象化合物を添加されたブランクマトリックスを用いた回収試験では完全には現れない他の因子によるものと考えられる。実残留物の回収率を評価するために、放射標識された実残留物又は標準参照物質がしばしば必要となる。

41. 比較的高濃度では、分析法の回収率は 100%に近いと予想される。低濃度では、特に分析法が広範囲の抽出、分離、及び濃縮操作を伴う場合には、回収率は高濃度のときよりも低くなる可能性がある。平均回収率がどのようなものであっても、必要に応じて信頼性のある補正を最終結果に対して行うことができるように、変動の小さい回収率が望ましい。

42. 一般に、平均回収率が 70～120%の範囲内にある場合、残留データは回収率補正をする必要はない。回収率の補正は、CAC/GL 37-2001⁸に示されるガイドラインに従って行われることが望ましい。これにより、データセットの直接比較が容易になる。補正関数は、適切な統計的考察に基づいて確立され、文書化され、保管され、依頼者及び査閲者に利用可能にされる事が望ましい。データは、(a) 回収率の補正が適用されたかどうかを明確にし、(b) 回収率補正が適用された場合は、補正量及び算出方法を含めるべきである。

43. ISO IEC17025⁴に従い、技能試験プログラムに参加すべきである。残留農薬のモニタリングを行う世界中の試験室では、多くの技能試験スキームが利用可能である。試験室間試験も実施することができる。

分析対象化合物の同定及び確認法の性能基準

44. 過失誤差（試料調製中に起こる過失）が、間違いなく、MS 法における誤同定の最大の原因である。このため、すべての規制実施のため措置（MRL 超過又は MRL が設定されていない食品に対する規制）では、理想的には異なる試料調製法及び／又は分析法を用いて、オリジナル試料からの再試験用試料の再抽出及び再分析による結果の確認が必要である。

⁸ 分析測定における回収率情報の利用に関する統一 IUPAC ガイドライン（Harmonized IUPAC Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement）Pure & Appl. Chem., 71,1999; 337 – 348. [CAC/GL 37-2001](#)

45. 選択性は、同定法において第一に考慮する事項である。分析法は明確な同定を提供するために十分な選択性を有するべきである。クロマトグラフィー分離法と MS の組み合わせは、試料抽出液中の分析対象化合物を同定するのに非常に強力な組み合わせである。この方法により、クロマトグラフィーだけでは得ることのできない分析対象化合物の構造に関する情報が得られる。GC-MS 及び LC-MS 手法（フルスキャン、選択イオンモード、高分解能、タンデム MS/MS、ハイブリッドシステム、その他の先端技術）は、保持時間、クロマトグラムのピーク形状、イオン強度及び相対強度／比、質量精度及びその他の分析対象化合物の同定に有用となる重要なパラメータを提供する。しかしながら、特に、試験結果の確認が、代替となるカラムの化学的性質を用いて行われる場合、非 MS ベースの技術（例：フォトダイオードアレイ検出 HPLC、元素選択的検出 GC）を用いて結果が良好な方法を開発して適用することができる。⁹

A. MS法による同定 MS-Based Identification

46. 一般に受け入れられている同定のための評価基準は存在しない。表 1 に評価基準の例を示す。

47. 残留農薬の定性及び定量分析における現在の手法は、クロマトグラフィー+選択イオン検出 (SIM) 法又は MS/MS 法を一般的に含んでいる。フルスペクトル MS 法もまた受け入れられる手法であり、スペクトルライブラリマッチングファクター及び／又はフルスペクトル内の主要イオンの相対強度比を使用する。前者の場合は、少なくとも 3 個のイオンを用いて、次に示すイオン比の評価基準を適用することができる。後者の場合、規制目的のための同定では、マッチングファクターを使用することが望ましく、また、ライブラリーの参照スペクトルは、試料分析と同じ条件を用いて同じ装置で、バックグラウンドを差し引いた高純度の標準物質から取得することが望ましい。次の同定の評価基準を満たすべきである。

- (a) 分析対象化合物の保持時間の参照値は、（同一バッチ内で）同時に分析された高濃度のマトリックスマッチ検量線用標準溶液から決定されるべきである。あるいは、妨害がないことがわかっている場合は、溶媒ベースの標準溶液を使用することができる。
- (b) イオン比の参照値は、47 a 項と同様に設定されるべきである。同定に使用される異なるイオンは、一緒に溶出され、同様のピーク形状を示さなくてはならない。検量線用標準物質から得られたイオンのうち平均強度のより高いイオンを百分率で表されるイオン比の分母として用いる（シグナル変動、マトリックス効果などによるイオン比の変化は 30%まで許容される）。
- (c) 測定されたピークの SN 比は 3 以上でなければならず、及び／又は対象濃度を含む適切な検量線用標準物質又は対照の信号と比較して、信号は閾値強度レベルを超えている事が望ましい。
- (d) 同定の目的で選択されたイオントランジションは、化学的／構造的に理にかなったものであることが望ましい（選定されたイオンは、分解物、不純物又は分析対象化合物以外の他の化合物と混同していないことを確認する）。
- (e) すべての測定された試薬及びマトリックスブランク試料は、LOQ の 20%以上の応答のキャリーオーバー、コンタミネーション及び／又は妨害がない事が望ましい。マトリックスブランク試料については、LOQ の 30%が許容可能である。
- (f) MS 分析では、質量/電荷比が 100 より大きいイオンをモニターすることが好ましい。

48. 分析対象化合物の許容される最小保持時間は、カラムのボイド（デッド）ボリュームに対応する保持時間の 2 倍以上とすべきである。抽出液中の分析対象化合物の保持時間は、ガスクロマトグラフィーと液体クロマトグラフィーのいずれについても参照値 (47a) の保持時間 ± 0.2 分以内又は相対保持時間の 0.2% 以内（可能であれば望ましくは ± 0.1 分）となるべきである。

49. 高分解能質量分析法に基づく分析法は、ユニット分解能質量分析法では得られない、イオンの質量／電荷を正確に測定することでより高い信頼性を提供すると考えられる。質量分析検出器の機種や型が異なれば、同定の信頼性に関連する選択性の度合いも異なる。表 1 に例示した同定のための評価基準は、化合物の有無を証明するための絶対的な基準としてではなく、同定のためのガイドラインとしてみるべきである。

B. 確認 Confirmation

50. 最初の分析で明確な同定が得られないか定量分析の要件を満たさない場合は、確認分析が必要である。これには抽出液又は試料の再分析を含む場合がある。CXL/MRL を超える時は、試料の別の部分の確認分析が必要である。 稀な農薬とマトリックスの組み合わせの場合も、確認分析が推奨される。

⁹ Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis (CAC/GL40-1993)

51. 最初の確認法が MS 法に基づいていない場合、確認法には MS による分析対象化合物の同定を含むべきである。更に、確認法には異なる化学的メカニズムに基づく独立したアプローチ (LC や GC 分離など) を用いるべきである。場合によって、独立した試験室による確認が適切と思われる。確認方法の基準を満たすのに適切と思われる分析法の例を表 2 にまとめる。

表 1 異なる MS 技術における同定基準

MS 検出器/ 特性	一般的なシステム (例)	アキュイジション	同定のための要件	
			最小イオン数	その他
ユニット質量分解能	四重極、イオントラップ、TOF	フルスキャン、限定された m/z 範囲、SIM	3 イオン	S/N $\geq 3^e$ 抽出されたイオンクロマトグラムにおける分析対象化合物のピークは、完全に重なり合わなければならない。
MS/MS	トリプル四重極、イオントラップ、Q-トラップ、Q-TOF、Q-オービトラップ	選択又は多重反応モニタリング、ユニットマス分解能と同等以上のプリカーサーイオン分離のための質量分解能	2 プロダクトイオン	
精密質量測定	高分分解能 MS: TOF 又は Q-TOF オービトラップ又は Q-オービトラップ FT-ICR-MS 磁場型 MS	フルスキャン、限定された m/z 範囲、SIM、プリカーサーイオンの選択あり又はなしのフラグメンテーション、又はその組合せ	2 イオン (質量精度 ≤ 5 ppm ^{a, b, c})	
		シングルステージ MS とユニットマス分解能と同等以上のプリカーサーイオン分離のための質量分解能を有する MS/MS の組み合わせ	2 イオン: 1 分子イオン、プロトン付加分子 (脱プロトン分子) 又は付加イオン (質量精度 ≤ 5 ppm 以下 ^{a, c}) 及び 1 MS/MS プロダクトイオン ^d	

^a) 分子イオン、プロトン付加分子 (脱プロトン分子) 又は付加イオンを含んでいることが望ましい。

^b) 1 つ以上のフラグメントイオンを含む

^c) m/z 200 の場合 < 1 mDa

^d) 5 ppm 以下

^e) ノイズが無い場合、少なくとも 5 回の連続スキャンで信号が存在していることが望ましい。

^f) プリカーサーイオン及びそのプロダクトイオンの質量精度が ≤ 5 ppm の場合は、イオン比の許容範囲は任意である。

表 2 物質の確認分析に適した検出法の例

検出法	評価規準
LC 又は GC 及び MS	十分な数のフラグメントイオンが観察される場合
LC-DAD	UV スペクトルが特徴的である場合
LC-蛍光分光	他の手法との組み合わせで
2-D TLC (分光光度法)	他の手法との組み合わせで
GC-ECD、NPD、FPD	2 種類以上の分離法を組み合わせただけの場合のみ
LC-イムノアフィニティー	他の手法との組み合わせで
LC-UV/VIS (単一波長)	他の手法との組み合わせで

定義

分析対象化合物 Analyte : 検出又は定量の対象である試料中の化学物質 分析用語に関するガイドライン (CAC/GL 72-2009)。

分析対象化合物保護剤 Analyte protectant : ガスクロマトグラフシステムにおいて強く相互作用して活性点を塞ぐ化合物で、これにより分析対象化合物が活性点と相互作用するのを抑え、ピークテーリングや損失を防いで、その結果、分析対象化合物のより高い応答が得られる。

適用可能性 Applicability : 分析法を十分に活用できる分析対象化合物、マトリックス及び濃度 分析用語に関するガイドライン (CAC/GL 72-2009)。

変動係数 Coefficient of Variation (CV) : 相対標準偏差 (Relative Standard Deviation, RSD) とされることが多い。これは、平均値の異なる複数組の値のばらつきを比較する定量的試験における精度の尺度である。

確認 Confirmation : 少なくとも 1 つは同定の評価基準を満たす、互いに一致している二つ以上の分析の組み合わせ。

確認法 Confirmatory method : 前回の結果に一致する補完情報を提示することができる方法。理想的には、初回の分析とは化学的メカニズムの異なる分析法を用いて異なるサブサンプルを分析する。これらの分析法の一つは、対象濃度において許容可能な確かさを持って分析対象化合物の同定の評価基準を満たす。

分解物 (分解物、分解生成物) Degradate (degradant, degradation product) : 農薬の非生物的变化 (例：熱、光、水分、pH など) の結果として食品中で生じる残留農薬の成分

偽陽性 False positive : 分析対象化合物が存在するか、又は規定濃度 (例：CXL/MRL 又は報告レベル) を超えていることを誤って示す結果。

偽陰性 False negative : 分析対象化合物が存在しないか、又は規定濃度 (例：CXL/MRL 又は報告レベル) を超えていないことを誤って示す結果。

添加 Fortification : 回収率を求める目的で分析対象化合物を添加すること (spiking ともいう)。

同定 Identification : 残留の定義のすべて又は任意の成分の化学的同一性を明確に決定するプロセス。

実残留物 Incurred residue : 試料の試験室での添加により存在する残留物とは対照的に、農薬の特定の使用、動物による摂取又は野外での環境汚染の結果として食品中に生じる残留物

妨害 Interference : 装置、環境、分析法又は試料に関連した電子的、化学的又はその他の因子による分析対象化合物に関連しない内因性又は外因性の応答 (例：ノイズ)。

妨害物質 Interferent : 妨害を引き起こす化学物質又はその他の因子。

内標準 Internal standard (IS) : 化学分析において試料及び/又は標準物質に既知量で添加される化学物質で、ブランク及び検量線用標準を含む。そして、内部標準物質の信号に対する分析対象化合物の信号の比を濃度の関数としてプロットすることにより、この物質を検量線に使用することができる。次いで、試料についてのこの比は、分析対象化合物の濃度を求めるのに用いられる。使用される内標準は、多くの点で分析対象化合物の信号と同様の信号を示すが、2つの信号は容易に区別できる程度に十分に異なっている必要がある。

検出限界 Limit of Detection (LOD): 試料中で検出することができる (しかし、定量することができない) 分析対象化合物の最低濃度または量。実際には、これは一般的には、平均の S/N が 3 である分析対象化合物濃度である。

定量限界 Limit of quantification (LOQ) : 定量化できる分析対象化合物の最低濃度。一般に、試験の規定された条件下で、許容可能な精度 (くり返し性 repeatability) 及び精確さ (accuracy) で決定することができる試験試料中の分析対象化合物の最小濃度として定義される。この文書の範囲では、一般的に平均の S/N が 10 となる分析対象化合物濃度である (26 項も参照の事)。

直線性 Linearity : 一定範囲内において、試験室試料中の測定対象となる分析対象化合物の量に比例して分析機器の応答又は分析結果が得られる分析法の能力 分析用語に関するガイドライン (CAC/GL 72-2009)。

最低検量線濃度 Lowest Calibrated Level (LCL) : 分析バッチを通じて、測定系が正常に校正される最低濃度 (又は量)。

最低妥当性評価濃度 Lowest Validated Level (LVL) : 分析法の性能基準を満たす、妥当性評価された最低添加濃度。

マトリックス Matrix : 残留農薬試験のためにサンプリングされる物質又は成分 (例：食品)。

マトリックスブランク Matrix blank : 目的の分析対象化合物を検出可能な濃度で含まない試料物質又は試料部分。

マトリックス効果 Matrix effect : 分析対象化合物の濃度又は量の測定に対する試料由来の 1 つ以上の検出されない成分の影響。

マトリックスマッチ標準液 Matrix-matched standards : 試料のものと類似のマトリックスブランクの最終抽出液で調製された標準溶液。

代謝物 Metabolites : 生物系 (例：植物、動物) における農薬の生物学的変換 (代謝) の結果として、食品中に生ずる残留農薬の成分。

多成分残留分析法 Multiresidue method (MRM) : 一般的に化学的分類の異なる多数の化合物の定量が可能な分析法。

精度 Precision : 平均値付近の測定値のばらつきの程度。

定量分析法 Quantitative method : 規定の評価基準に適合する真度と精度をもって分析対象化合物の濃度の (確定) 結果を与えることができる分析法。

回収率 Recovery : 検出可能な濃度の分析対象化合物を含まないか又は既知の検出可能な濃度の分析対象化合物を含むいずれかの適切なマトリックスの試料に、独自に添加された (残留の定義に従った) 分析対象化合物の量の百分率として測定された量。回収実験は、精度と真度の両方の情報が得られることにより、分析法の精確さに関する情報を提供する。

相対標準偏差 Relative Standard Deviation (RSD) : 標準偏差を算術平均値の絶対値で除し、百分率で表される。分析法の精度を示す (変動係数 (CV) としても知られる)。

繰返し性 (併行精度) Repeatability : 同一の測定手順又は試験手順、同一の作業員、同一条件下での同一の測定機器又は試験機器の使用、同一の場所で短時間で反復実施により得られた精度であり、通常 RSD で表される 分析用語に関するガイドライン (CAC/GL 72-2009)。

再現性 (再現精度) Reproducibility : 異なる試験/測定施設において、異なる作業員により異なる機器を用いて、同一の試験/測定項目について同一の分析法により、独立した試験/測定結果が得られるような観察条件で得られた精度 (通常 RSD で表される) 分析用語に関するガイドライン (CAC/GL 72-2009)。

残留の定義 Residue Definition : 親化合物、代謝物、異性体、反応生成物及び/又は分解物を含むことができる分析すべき化合物の範囲。残留の定義は、通常、規制機関によって決定される。

堅牢性 Ruggedness : 分析法のパラメータにわずかではあるが故意の変動があっても、その影響を受けない分析手順の能力の尺度であり、通常使用時の信頼性の指標となる 分析用語に関するガイドライン (CAC/GL 72-2009)。

試料調製 Sample preparation : 試料の試験試料の抽出、その精製及び分析用の試料溶液に至るそのほかの過程ステップを含む。

スクリーニング検出限界 Screening Detection Limit (SDL) : 95%信頼水準で確かさを有していることが示されている最低添加濃度。

スクリーニング分析法 Screening Method : 対象となる最小濃度以上で、分析対象化合物又は分析対象化合物の種類の有無を検出するために予め設定された評価基準を満たす分析法。

選択性 Selectivity : 分析法が、挙動が類似する他の化合物による干渉を受けずに混合物又はマトリックス中の特定の分析対象化合物を測定できる程度 分析用語に関するガイドライン (CAC/GL 72-2009)。

感度 Sensitivity : ある測定系の指標値の変化と、それに対応する被測定量の値の変化の商 分析用語に関するガイドライン (CAC/GL 72-2009)。

SIM : 選択イオン検出 (質量分析検出技術の一つ)

単成分残留分析法 Single Residue Method : 単一の分析対象化合物又は類似の物理化学的性質を有するグループの分析対象化合物を定量する分析法。

標準添加法 Standard addition：標準添加法は、既知量の分析対象化合物を最終抽出液の一定量に直接添加することによる定量分析手法の一種で、分析化学で時に用いられる。

TOF：飛行時間（質量分析で使用される検出手法）

真度 Trueness：無限数の反復測定によって得られる平均値と、基準となる定量値との一致度 *分析用語に関するガイドライン*（CAC/GL 72-2009）。

不確かさ Uncertainty：合理的に測定に起因して得られたと考えられる値のばらつきを特徴付ける測定結果に関連するパラメータ。

(参考) 目次

	項
目的	1-3
分析法の選定及び妥当性評価に関する原則	4-10
A. 分析法の目的及び適用範囲の規定	4-7
B. 他のコーデックス委員会ガイドラインの補完	8-9
C. 分析法の妥当性評価	10
分析法の性能パラメータ	11-31
A. 分析法の文書	12
B. 選択性	13-14
C. 較正	15-16
D. 直線性	17-18
E. マトリックス効果	19
F. 真度及び回収率	20-21
G. 精度	22-25
H. 定量下限	26
I. 分析範囲	27
J. 堅牢性	28-29
K. 測定不確かさ	30-31
スクリーニング分析法の性能基準	32-34
定量分析法の性能基準	35-43
分析対象化合物の同定及び確認法の性能許準	44-51
A. MS 法による同定	46-49
B. 確認	50-51
表	
定義	別紙

